UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N° 137

ETUDE DE LA CONTAMINATION PARTICULAIRE DES MEDICAMENTS PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ANALYTIQUE

Application aux formes injectables et à la recherche d'amiante dans les talcs

THESE

présentée à l'Université Claude-Bernard

Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 11 Juillet 1977

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Jean-François PONSOT

né le 22 Août 1953

à LYON (Rhône)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545306_0001

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N°

ETUDE DE LA CONTAMINATION PARTICULAIRE DES MEDICAMENTS PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ANALYTIQUE

Application aux formes injectables et à la recherche d'amiante dans les talcs

THESE

présentée à l'Université Claude-Bernard
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 11 Juillet 1977
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Jean-François PONSOT
né le 22 Août 1953
à LYON (Rhône)

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD

PRESIDENT : M. le Professeur D. GERMAIN

PREMIER VICE-PRESIDENT : M. le Professeur ELBAZ

DEUXIEME VICE-PRESIDENT : M. P. PONCET, Maître-Assistant

TROISIEME VICE-PRESIDENT : M. C. BADOR, Etudiant

SECRETAIRE GENERAL DE L'UNIVERSITE : M. J. RAMBAUD, Administrateur Civil

DIRECTEURS DES UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

U.E.R. de MEDECINE GRANGE-BLANCHE : Monsieur Bernard SALLE, M.C.A.

U.E.R. de MEDECINE ALEXIS-CARREL : Monsieur le Pr René MORNEX

U.E.R. de MEDECINE LYON-NORD : Monsieur Jean-Pierre NEIDHART, M.C.A.

U.E.R. de MEDECINE SUD-OUEST : Monsieur le Pr Jean NORMAND

U.E.R. des SCIENCES PHARMACEUTIQUES : Monsieur le Pr Charles-Albert BIZOLLON

U.E.R. de TECHNIQUES DE READAPTATION : Monsieur Alain MORGON, M.C.A.

U.E.R. de BIOLOGIE HUMAINE : Monsieur Jean-Pierre REVILLARD, M.C.A.

U.E.R. I.R.E.P.S. : Monsieur Albert MILLON, Professeur d'E.P.S.

U.E.R. de Sciences Odontologiques : Monsieur le Dr Roger VINCENT

U.E.R. de MATHEMATIQUES : Monsieur le Pr Edmond COMBET

U.E.R. de PHYSIQUE : Monsieur le Pr Jean DELMAU

U.E.R. de CHIMIE-BIOCHIMIE : Monsieur le Pr Jean HUET

U.E.R. de SCIENCES DE LA NATURE : Monsieur le Pr René GINET

U.E.R. de SCIENCES PHYSIOLOGIQUES : Mademoiselle le Pr Jeanne-Françoise WORBE

U.E.R. de PHYSIQUE-NUCLEAIRE : Monsieur le Pr Mark GUSAKOW

I.U.T. n° 1 : Monsieur le Pr Bernard POUYET

I.U.T. n° 2 : Monsieur J. CALLET, Directeur E.N.S.A.M.

OBSERVATOIRE DE LYON : Monsieur Guy MONNET, Astronome Adjoint

U.E.R. de MECANIQUE : Mademoiselle le Pr Geneviève COMTE-BELLOT.

-oooOooo-

JURY

M.M.	*Le Professeur Michel ROLLET*	*Président*
	Le Professeur Maurice CARRAZ	
	Le Professeur Paul CHAMBON	*Assesseurs*
	Le Docteur Jean-Alexis GRIMAUD	
	Le Professeur Louis REVOL	

TRAVAIL

du Laboratoire de Pharmacie Galénique Industrielle et Biogalénique,

de l'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES DE LYON

---

du Centre de Microscopie Electronique et de Pathologie Ultrastructurale

de l'INSTITUT PASTEUR DE LYON

A MES PARENTS

A MON FRERE

A MA SOEUR

en témoignage de ma profonde affection.

A la mémoire de MON GRAND-PERE

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. ROLLET

Il nous a proposé ce sujet de thèse et en a guidé la réalisation avec une disponibilité extrême.

La rigueur et le sens critique de son jugement sont à nos yeux le témoignage de l'aide et de l'intérêt qu'il a porté à notre travail.

En le remerciant de l'honneur qu'il nous fait d'accepter la présidence de notre thèse, nous l'assurons de notre fidèle dévouement et de notre respectueuse reconnaissance.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY :

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. REVOL

En nous accueillant alors que nous étions encore étudiant dans son laboratoire, il a sans nul doute fait éclore notre goût pour la pharmacie galénique.

Nous avons pu bénéficier à de nombreuses occasions de l'étendue de ses connaissances et de sa très grande richesse d'esprit.

Nous sommes profondément sensible à l'intérêt amical qu'il a bien voulu nous porter. En lui demandant de juger ce travail, nous espérons l'assurer de notre respectueuse gratitude.

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. CARRAZ

Il a bien voulu nous accueillir à l'Institut Pasteur de Lyon où nous avons apprécié son esprit d'entreprise.

L'intérêt qu'il a porté à nos recherches et la confiance qu'il nous a accordée ont été pour nous un précieux encouragement.

Nous ne saurions assez lui exprimer notre respectueuse gratitude.

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. CHAMBON

La simplicité de son accueil nous a toujours touché et nous avons pu apprécier l'étendue de ses connaissances et la qualité de son enseignement.

Qu'il nous soit permis de le remercier d'avoir bien voulu accepter de faire partie de ce jury.

MONSIEUR LE DOCTEUR J.A. GRIMAUD

En nous acceptant près de trois ans dans son laboratoire, il nous a fait bénéficier de ses vastes connaissances et permis d'apprécier sa grande activité

Microscopiste et anatomopathologiste, il a su, grâce à un esprit largement ouvert, fournir avec une aide précieuse les conditions les plus favorables à la réussite de notre entreprise.

Qu'il soit assuré en siègeant dans ce jury de notre profonde gratitude pour l'enrichissement personnel que nous avons trouvé sous son amicale autorité.

A MADAME YVETTE ARTHAUD

A MONSIEUR GILLES MOURETIN

A TOUTE L'EQUIPE

DU CENTRE DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

ET DE PATHOLOGIE ULTRASTRCTURALE

DE L'INSTITUT PASTEUR DE LYON

pour leur amitié et leur aide.

Nous tenons à remercier pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail et pour leur aide

MADAME FUSSELLIER et

MONSIEUR BAUME, pharmaciens.

A TOUS NOS AMIS

DE L'INSTITUT PASTEUR DE LYON

ET DU LABORATOIRE DE PHARMACIE GALENIQUE.

Nous sommes reconnaissant à MADEMOISELLE SCHWARTZ qui a assuré le travail de secrétaria de son aide précieuse.

S O M M A I R E

INTRODUCTION.

Première Partie :

LA CONTAMINATION PARTICULAIRE DES MEDICAMENTS.

1. Introduction - Historique.

2. Nature des contaminants particulaires.

3. Les causes de contamination
par des éléments particulaires.

4. Conséquences de la contamination particulaire
des médicaments.

5. Législation et Normalisation.

6. Les moyens de lutte
contre la contamination particulaire.

Deuxième Partie :

LES METHODES D'ETUDE DE LA
CONTAMINATION PARTICULAIRE DES MEDICAMENTS.

1. Généralités.

2. Les méthodes d'étude des particules
dans les solutés injectables.

3. Méthodes d'étude de la contamination particulaire
des formes pharmaceutiques autres que les
préparations injectables.

Troisième Partie :

APPLICATION DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ANALYTIQUE
A L'ETUDE DES CONTAMINANTS PARTICULAIRES
DE DEUX FORMES GALENIQUES :

- PREPARATIONS INJECTABLES : étude qualitative des particules.
- TALCS : recherche de l'amiante.

1. Introduction.

2. Mise au point d'un protocole d'étude de la contamination particulaire par microscopie électronique et micro-analyse.

3. Applications à divers cas de contamination.

CONCLUSIONS.

RESUME.

BIBLIOGRAPHIE.

TABLE DES MATIERES.

I N T R O D U C T I O N

Depuis une dizaine d'années, l'étude et le contrôle de la contamination particulaire des médicaments, et spécialement des formes injectables, ont pris une importance accrue. Nous nous proposons, après avoir dans la première partie de ce travail rappelé les problèmes posés par les contaminants particulaires, d'envisager dans une deuxième partie l'ensemble des méthodes d'étude de la contamination particulaire. Outre une discussion et un essai de contribution à la classification de ces méthodes, nous insisterons plus particulièrement sur les techniques d'analyse qualitative des particules.

La troisième partie de ce travail présente, d'une part, la mise au point d'une méthode d'étude qualitative des particules par microscopie électronique analytique et, d'autre part, des résultats provenant de l'application de cette méthode au contrôle de divers solutés injectables et talcs du commerce.

Une attention particulière est portée, tout au long de ce travail, à la contamination par les fibres d'amiante.

Première Partie

LA CONTAMINATION PARTICULAIRE DES MEDICAMENTS

1. INTRODUCTION - HISTORIQUE

L'une des principales préoccupations qui doivent guider le travail du pharmacien, responsable de la fabrication, de la mise sur le marché et de l'utilisation du médicament, est d'en garantir de la meilleure façon possible la pureté, laquelle présente plusieurs aspects :

- pureté chimique, c'est-à-dire conformité aux normes des pharmacopées (teneur limite en impuretés chimiques, titre en principe actif) ;
- pureté bactériologique ;
- pureté particulaire.

En effet, le médicament, dont la fonction essentielle est d'aider l'homme à demeurer en bonne santé, doit satisfaire impérativement à la notion d'hygiène et, pour cela, être constamment protégé contre la pollution et la contamination, ceci aussi bien pendant que après sa fabrication (13).

C'est pourquoi, conformément à ce souci de produire un médicament toujours plus pur et plus sûr, c'est-à-dire stable et d'une haute innocuité, l'Industrie Pharmaceutique se doit d'affirmer aujourd'hui sa volonté d'éliminer de toutes les formes pharmaceutiques les contaminants microbiens et les contaminants particulaires que les Américains désignent, par opposition aux précédents, sous le terme de "non microbial particulate contaminants" (N.M.P.C.).

Si, pour sa part, l'étude de la contamination microbienne des médicaments a déjà fait de gros progrès, les problèmes posés par les contaminants particulaires semblent soulever des difficultés considérables, aussi bien en ce qui concerne l'évaluation du risque qu'à propos du choix des méthodes d'étude, ce qui a eu pour conséquence jusqu'ici de rendre difficile l'élaboration de normes limites de contamination.

La contamination particulaire des médicaments concerne sans doute toutes les formes pharmaceutiques :

- formes solides et poudres (166) ;
- formes pâteuses ;
- formes pulsées ;
- formes liquides orales, oculaires, injectables, etc...

Cependant, certaines d'entre elles, en raison de leur voie d'administration et de l'éventualité d'une utilisation en traitements prolongés, voire massifs, doivent retenir plus particulièrement notre attention.

C'est pourquoi, nous avons choisi, dans la majeure partie de ce travail, de faire le plus souvent référence au cas de la contamination particulaire des formes injectables, qui est de loin le plus important et a été l'objet en conséquence des études les plus nombreuses.

En ce qui concerne les autres formes pour lesquelles le problème est moindre, nous aurons l'occasion de reconsidérer leurs cas au cours du développement de cet exposé, lorsque cela nous paraîtra nécessaire, étant entendu que ce que nous dirons des formes injectables peut servir, sous réserves d'adaptation à chaque cas particulier, de base de départ pour l'étude des autres formes (12, 71, 89, 118, 141, 159, 168, 231, 232, 235, 253).

Nous nous proposons, pour mieux comprendre l'évolution du problème de la contamination particulaire, de retracer dans un bref historique les étapes marquantes de l'étude des particules dans les solutés injectables.

Depuis que ces formes, dont la fabrication délicate nécessite une technologie complexe, sont fabriquées à grande échelle par l'Industrie Pharmaceutique, les pharmaciens responsables ont toujours vérifié avec soins la conformité de leurs fabrications aux normes des pharmacopées qui, il faut bien l'avouer, n'ont pas toujours été très précises dans le domaine de la contamination particulaire, comme nous le verrons plus loin.

Cependant, une attention plus grande fut portée aux particules lorsque VON GLAHN (277) observa, dès 1949, de nombreux granulomes intra-pulmonaires à l'autopsie de malades qui avaient reçu une thérapeutique intra-veineuse avant leur mort.

L'intérêt pour les particules dans les solutions intra-veineuses s'accrut de façon soudaine et considérable lorsque deux médecins australiens, GARVAN et GUNNER, signalèrent les grandes quantités de particules qui apparaissaient dans des solutions intra-veineuses de fabrication locale quand ils les observaient dans une boîte noire, le flacon étant placé sur le trajet d'un rayon lumineux. Leurs observations furent exposées dans deux articles publiés en 1963 (82) et en 1964 (84), la source de la plupart des particules, selon ces auteurs, était constituée par les bouchons en caoutchouc.

Par la suite, furent examinés de nombreux échantillons de solutions pour injections intra-veineuses fabriquées en Australie, en Angleterre, en Europe, aux Phillipines et aux Etats-Unis ; ils trouvèrent seulement trois échantillons qui fussent exempts de particules décelables par leur méthode.

Des études in vivo, réalisées par ces mêmes auteurs, montrent, dans les poumons des lapins, des granulomes dont chacun contenait des fragments de particules de cellulose. Ils estiment que, pour chaque demi-litre de fluide intra-veineux injecté dans chaque lapin, il y avait 5.000 granulomes répartis dans les poumons.

La réaction australienne à ces découvertes consista en une recherche d'une fabrication de fermetures supérieures à celles qui étaient utilisées.

En adaptant à la solution de ce problème les compteurs COULTER, GROVES et MAJOR (100) en Angleterre, puis VESSEY et KENDALL (273) en Australie, ont mis au point une étude visant à déterminer l'origine exacte de la pollution, de même que son niveau moyen. Ceux-ci confirmèrent que les fermetures par bouchons laqués étaient préférables, ce qui conduisit à un essai de 50.000 fermetures en caoutchouc faites à partir d'une formulation pharmaceutique américaine et laquées avec un revêtement américain (123).

Aux Etats-Unis, l'intérêt soulevé par les rapports de GARVAN et GUNNER incita de nombreux chercheurs à commencer des études dans les mêmes directions et, en juillet 1966, la "Food and Drug Administration" organisa un symposium de deux jours à Washington sur la sécurité des solutés injectables de grand volume (205).

Tous ces évènements suscitèrent un intérêt considérable, prioritaire et nouveau, de la part des fabricants (258) et des autorités de normalisation ; il en résulta une masse importante de publications ayant trait à la détection, à la détermination et aux méthodes technologiques adaptées pour diminuer la contamination particulaire dans les solutés injectables.

Nous présenterons, tout au long de ce travail et à leur place, des références traitant pour la plupart de points très particuliers et spécifiques. De plus, il nous a paru nécessaire d'indiquer dès maintenant quelques articles qui, regroupant la littérature publiée, permettent de faire le point de la situation :

- une revue détaillée de la littérature, publiée en 1969 par HERSEY (114) ;
- une revue des publications ayant trait principalement à la signification clinique des matières particulaires (46 références), réalisée en 1973 par TURCO et DAVIS (265) ;
- un rapport d'une Commission de travail de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques en 1973 (241).

Concernant les travaux effectués dans les laboratoires pharmaceutiques pour prévenir la contamination particulaire, deux publications parues en 1973, d'AZRIA (13) et de GUICHARD (102), nous paraissent donner un point de vue intéressant sur ce problème.

On peut rappeler d'ailleurs, à cette occasion, que dans le domaine de la contamination particulaire l'Industrie Pharmaceutique bénéficie d'un important acquis scientifique et technique des industries de l'électronique et de l'aéronautique qui sont confrontées depuis longtemps avec ces problèmes.

Enfin, il convient d'insister particulièrement sur un type de contaminant particulaire fibreux, l'amiante, en raison de sa toxicité. Ce matériau, connu comme toxique professionnel depuis longtemps, a été signalé dans diverses préparations injectables, dès 1972, par NICHOLSON, MAGGIORE et SELIKOFF (182), ainsi que dans des talcs (46, 169, 41).

A l'heure actuelle, on constate une recrudescence des attaques portées contre l'amiante que l'on accuse non plus seulement de donner lieu à des maladies professionnelles, mais auquel on reproche de devenir insidieusement un polluant général de tout notre environnement (air, eau, produits de consommation).

Pour mieux comprendre ce que représente la contamination particulaire des médicaments, nous nous proposons d'aborder successivement les points suivants :

- Nature des contaminants particulaires.
- Origine des contaminants particulaires.
- Conséquences de la contamination particulaire.
- Législation et normes.
- Moyens de lutte et de prévention.

2. NATURE DES CONTAMINANTS PARTICULAIRES

2.1. DEFINITION - TERMINOLOGIE -

Nous avons jusqu'ici parlé des contaminants particulaires en les opposant aux micro-organismes d'une part, et aux impuretés chimiques liquides ou gazeuses d'autre part. Une définition négative n'étant pas satisfaisante, il nous paraît bon, avant d'aller plus loin, d'essayer de préciser le sens de ce terme ainsi que ses limites dans le cadre de nos préoccupations.

Sachant qu'il est difficile de trouver une définition qui soit à la fois courte et exhaustive, nous citerons quelques-unes d'entre elles. Celle proposée par KRUEGER concerne les particules dans les solutions parentérales (144) :

> "Substances mobiles, non solubles, présentes
> "de façon involontaire dans les solutions
> "parentérales".

AZRIA (13) propose une définition plus complète et pouvant être généralisée à toute préparation pharmaceutique :

> "Tout élément indésirable, visible ou invisible
> "à l'oeil nu, qui normalement ne doit pas accom-
> "pagner une préparation pharmaceutique ou son
> "matériel d'administration, sera considéré comme
> "contaminant particulaire, que sa présence ait
> "ou non des conséquences reconnues ou non encore
> "prouvées sur les caractères organoleptiques, la
> "stabilité et l'innocuité de la préparation".

On peut tenter de compléter cette définition en précisant la nature et l'origine de ces particules.

2.2. RECENSEMENT ET CLASSIFICATION DES PRINCIPAUX CONTAMINANTS -

Les moyens mis en oeuvre semblent être apparus en deux temps :

- dans un premier temps, à défaut de posséder des méthodes d'étude qualitative efficaces, du moins en ce qui concerne les plus petites particules, on a été amené à déduire leur nature et leur origine des différentes opérations et du matériel utilisés dans la préparation et l'utilisation des solutés injectables ;
- dans un deuxième temps, il est devenu possible de faire appel à des techniques d'étude de plus en plus fines, notamment grâce aux progrès réalisés dans les domaines de la microscopie optique, puis électronique, ainsi que dans ceux de la spectroscopie.

C'est ainsi que DRAFTZ et GRAF (62), GARVAN et GUNNER (85), de même que HURST cité par ARAUD (9), les ont identifiées après examen microscopique et grâce à des techniques d'analyse micro-chimiques. Ils les ont classées en trois catégories :

- PARTICULES DE CAOUTCHOUC.
- PARTICULES DITES CHIMIQUES, classées elles-mêmes en fonction de l'aspect et de la couleur pris sous la lumière du microscope et d'après les réactions micro-chimiques :
  - particules de 1 µm et moins, formant un dépôt de couleur noire, brune, jaune ou verte ;
  - grands cristaux colorés en jaune le plus souvent, ou en rose ;
  - grands cristaux transparents anisotropiques, présentant des couleurs d'interférence à la lumière polarisée. Leur identification est difficile ; cependant, les auteurs ont mis en évidence la présence de charbon, d'oxyde de zinc et de silicates.
- PARTICULES ORGANIQUES : fibres de cellulose, champignons, fragments de cheveux, grains d'amidon, diatomées.

AZRIA (13) d'une part, et une Commission de la S.F.S.T.P. (241) d'autre part, ont pu donner des listes assez complètes qui permettent d'envisager, certes de façon non exhaustive, la nature de ces contaminants. Nous nous proposons de refondre ces deux listes dans la classification suivante (49, 142) :

- LES CONTAMINANTS MINERAUX :

  . Le verre, sous forme d'éclats, de particules ou de fibres.

  . Les débris métalliques : différents alliages, cuivre, fer, chrome, aluminium, sous forme de copeaux, de particules.

  . L'amiante, matériau fibreux particulièrement dangereux, dont on utilise deux formes cristallographiques : les serpentines et les amphiboles (178).

- LES CONTAMINANTS ORGANIQUES :

  Ils peuvent provenir de matériaux synthétiques dont l'utilisation est en expansion constante :

  . Elastomères - caoutchouc, matières plastiques, fibres synthétiques.

  Ils peuvent aussi provenir de matériaux organiques de natures diverses :

  . Morceaux d'êtres vivants (hommes, animaux, rongeurs, insectes) : poils, cheveux, pellicules, ongles, spores végétales (10 à 30 µm), pollen (10 à 100 µm), insectes ou fragments d'insectes.

  . Fibres naturelles : cellulose, fibres textiles, papier, sacs, liasses, jute, ...

3. LES CAUSES DE CONTAMINATION PAR DES ELEMENTS PARTICULAIRES

(4, 3, 8, 37, 63, 64, 108, 134, 202, 251)

Les sources de contamination particulaire sont innombrables et, sans doute, parfois insoupçonnées ; nous tenterons cependant d'en donner une idée générale en reprenant la classification d'AZRIA (13).

3.1. SOURCES PRIMAIRES OU DIRECTES -

3.1.1. L'ENVIRONNEMENT TERRESTRE, AQUATIQUE et AERIEN,

meublé et habité, fournit le lot le plus important des contaminants particulaires.

Il est chargé en permanence d'éléments de toutes sortes, appelés "aéropolluants", dont le principal véhicule est l'air. A titre d'exemple, on observe quelques 5.000 particules supérieures à 0,5 µm par m^3 dans une campagne éloignée de toute source de pollution, et 2.000.000 à 3.000.000 de particules par cm^3 dans une pièce d'habitation où l'on a fumé (102).

Parmi ces aéropolluants, on rencontre essentiellement des résidus de combustion, des fumées parfois incomplètement comburées, des cendres volantes, des débris végétaux, des fibres diverses, des rejets humains et animaux, des particules minérales, organiques, terreuses.

3.1.2. L'HOMME LUI-MEME EMET UNE QUANTITE CONSIDERABLE DE PARTICULES DIVERSES.

La figure 1 illustre et indique les valeurs moyennes du nombre de particules de plus de 0,[illegible] de diamètre émises ou brassées par minute, en fonction de l'activité de l'individu.

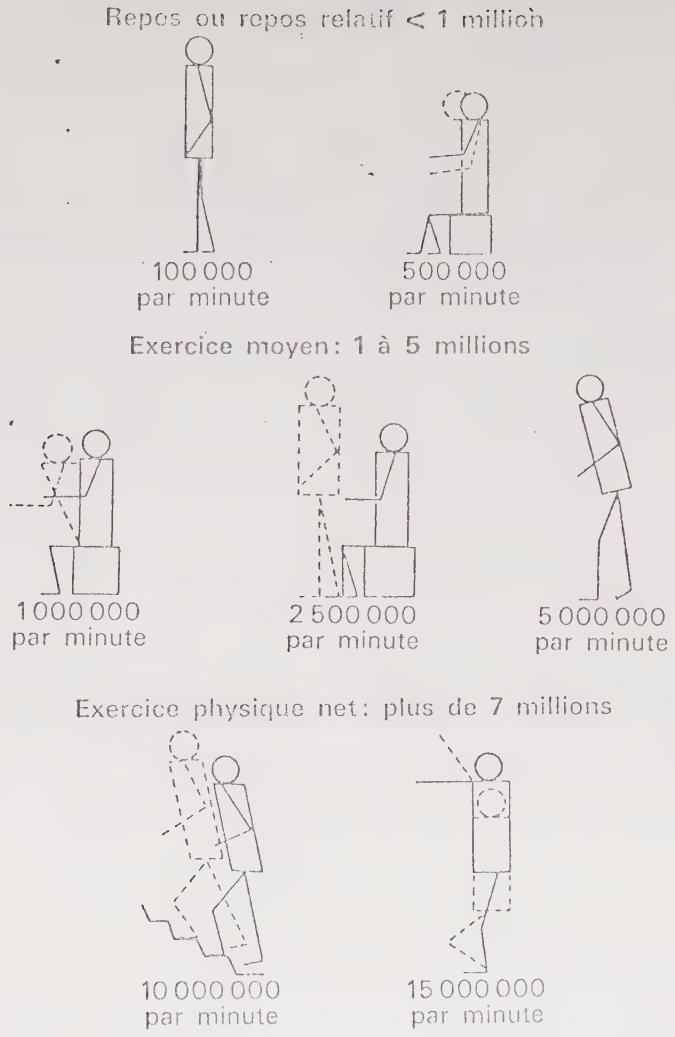


Figure 1 : Quantité de particules de diamètre supérieur à 0,3 µ pouvant être émises ou brassées par un individu en fonction de son activité d'après GUICHARD (102).

Ces particules sont transportées sous diverses formes que l'on peut classer en trois catégories :

- les poussières supports, qui sont de grosses particules capables d'agglomérer ou d'adsorber les micro-organismes et sédimentent assez rapidement ;
- les postillons émis principalement par l'homme, de 1 à 2 mm de diamètre ; ils sont en évolution constante et rapide dans le temps et l'espace sous l'influence de l'évaporation ;
- les noyaux de condensation, de 2 à 8 µm de diamètre, résultant de l'évaporation des précédentes. Ceux-ci sédimentent très lentement, d'où une contamination prolongée de l'atmosphère et leur transport à longue distance.

L'environnement ainsi décrit va, à son tour, être lui-même directement ou indirectement à l'origine de diverses contaminations d'un médicament, depuis sa naissance jusqu'à son utilisation.

3.2. SOURCES SECONDAIRES OU INDIRECTES -

Non moins importantes, elles sont soit liées avec les premières (sources exogènes), soit indépendantes (sources endogènes). Nous allons brièvement les évoquer (211).

3.2.1. LES LOCAUX DE TRAVAIL. (FABRICATION ET STOCKAGE)

Une mauvaise conception peut être à l'origine de pollutions : pièces trop grandes, surfaces peu lisses, nids à poussières, fissures murales (où se logent des insectes), plafonds isolés avec des matériaux à base d'asbeste, conditionnement d'air absent ou inadéquat (air non filtré, mal dépoussiéré), courants d'air, travail avec portes ou fenêtres permettant l'entrée de mouches, guêpes, moustiques ou même de prédateurs vrais (rats, souris) et d'infestateurs secondaires (oiseaux), qui deviennent des générateurs de contaminants particulaires, ne serait-ce que par leurs excréments !

AGNEV et coll., cités par AZRIA (13), ont montré que le nombre de particules dans une pièce de travail conventionnelle propre dépend des personnes présentes et des types de travaux qui y sont effectués (figure 2) :

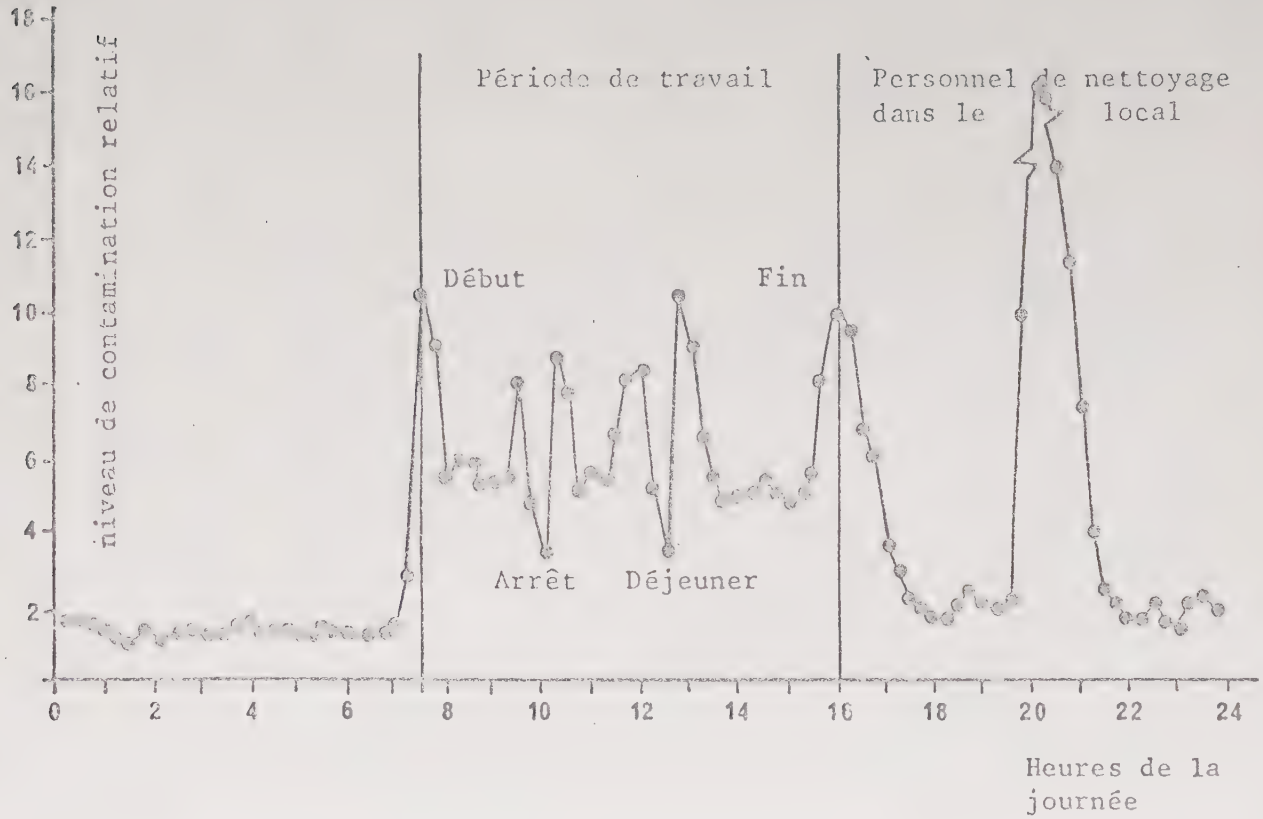


Figure 2 : Influence du personnel sur le taux de contamination particulaire dans une pièce conventionnelle propre.

- avant le commencement du travail, le matin, une certaine valeur de base est mesurée ; elle peut être voisine de la classe 100 (189) s'il n'y a ni machine en marche, ni personnel. Dès le démarrage des activités, le nombre de particules augmente considérablement, puis il se produit une chute au moment des pauses, du déjeuner, et à la fin de la période de travail. Mais on doit noter que le plus haut degré de contamination est obtenu le soir, lors du nettoyage.

3.2.2. LE PERSONNEL.

Nous avons vu que le personnel est un émetteur de contaminants particulaires par excellence ; il peut donc souiller les produits au cours de la fabrication.

L'hygiène des mains revêt une importance toute particulière, car c'est par des mains polluées et sans protection que se produit souvent une contamination.

L'absence de vêtements de travail adéquats (chaussures, gants, combinaisons, couvre-chefs, masques, ...) est très néfaste pour la propreté des produits fabriqués. Les vêtements de travail peuvent également être fortement générateurs de contaminants particulaires s'ils sont en fibres discontinues (coton, par exemple).

3.2.3. LES OPERATIONS D'ENTRETIEN.

Le nettoyage des récipients, des machines et des locaux de travail, peut être catastrophique s'il est mal conduit :

- emploi d'air comprimé ou d'eau pollués pour le nettoyage des récipients ou des machines ;
- mauvais nettoyage de certains matériels, tels les homogénéiseurs qui possèdent des endroits difficilement accessibles ;
- lavage ou balayage des sols pendant les opérations.

3.2.4. LES MATIERES PREMIERES.

Sources endogènes par excellence, les matières premières peuvent être des agents importants de pollution à plusieurs titres :

- produits fortement souillés à l'origine, tels que extraits de plantes, produits opothérapiques, produits naturels (talc, amidon, ...) ;
- produits contenant poussières, insectes, particules métalliques, fibres de papier, de cellulose ... (saccharose, chlorure de sodium, ...) ;

- produits mal emballés (emballage unique, sans double enveloppe, avec agrafes qui, entraînées dans un broyeur par exemple, engendrent des particules métalliques).

L'utilisation d'un matériel de prélèvement pour analyse mal entretenu (sondes) polluera les matières premières.

Matière première de très grande importance en fabrication, l'eau peut, elle aussi, apporter beaucoup de contaminants particulaires :

- ELLO et coll., toujours cités par AZRIA (13), ont évalué le nombre de particules contenues dans l'eau distillée provenant de différents appareils à distiller. Leur origine est variée : conduites, robinets, joints, frottements de l'eau avec les récipients ;
- l'eau désionisée, non filtrée convenablement, contient en quantité plus ou moins importante des petits grains de résine provenant des colonnes.

Pour les matières premières solides, LACHMAN et coll. (145) ont évalué, dans une cinquantaine de laboratoires pharmaceutiques, les fréquences des différents types de contaminants métalliques rencontrés dans diverses matières premières, par exemple :

Tableau I : CONTAMINANTS METALLIQUES TROUVES DANS LES MATIERES PREMIERES d'après LACHMAN (145).

TYPES DE CONTAMINANTS	FREQUENCE (%)
Fer.....	79 %
Acier inoxydable.....	42 %
Cuivre.....	27 %
Aluminium.....	23 %

Le sucre, lors de sa fabrication, se présente, après cristallisation, sous forme de grains qui sont séchés, broyés et transportés à l'aide d'air comprimé. Une très grande surface est alors exposée aux souillures possibles, sur laquelle un grand nombre de contaminants particulaires peut se déposer.

Le talc est une matière première très utilisée dans l'Industrie Pharmaceutique (talc excipient) et surtout Cosmétique (poudres de toilette, poudres de soins pour bébés). Ce minéral est extrait à plus de 3 millions de tonnes par an, dont environ un cinquième est utilisé par ces industries. Les talcs sont d'origines géographiques diverses (41) :

42 % viennent des Etats-Unis,
17 % de Chine (Mandchourie),
11 % de France,
13 % d'Italie,
5 % de l'Inde,
3 % du Canada.

Or, nous l'avons dit, plusieurs auteurs ont signalé le danger de certains talcs contenant de l'amiante sous forme d'amphibole ou de serpentine. En effet, ces deux minéraux sont par leur origine, leur localisation géologique, leur formation et leur structure chimique, apparentés au talc. Il est donc possible que, lors de l'extraction, des fibres d'amiante puissent être mélangées au talc.

3.2.5. LES CONDITIONNEMENTS.

Les articles de conditionnement peuvent être générateurs de contaminants particulaires de diverses manières (35, 57, 68, 74, 81, 113, 115, 127, 180, 247) :

- Les conditionnements vides peuvent être pollués soit parce qu'ils sont sales à l'origine, comme les tubes de pommades, soit parce qu'ils sont stockés dans de mauvaises conditions d'hygiène. Ils peuvent également être mal nettoyés si, par exemple, ils sont lavés ou rincés avec de l'air ou de l'eau contaminés. De même, s'ils sont chargés électriquement, ils accumuleront les poussières.

- Les conditionnements peuvent céder des particules provenant de leur propre structure, qu'il s'agisse d'un matériau en verre, en métal, en matière plastique ou en élastomère. Les revêtements intérieurs de certains contenants peuvent se détacher plus ou moins et contaminer les contenus : c'est le cas, par exemple, du vernis intérieur des tubes pour pommades, lesquels ont également un embout métallique susceptible de libérer également des particules de métal à l'ouverture du tube.
- Il faut souligner aussi la possibilité d'incompatibilité de toutes sortes entre le contenant et le contenu à la suite d'un mauvais choix du matériau d'emballage : à partir de produits extractibles, des précipités peuvent se produire et devenir sources de particules.

C'est, bien entendu, dans le cas des formes injectables que ces mécanismes de contamination sont les plus intéressants à étudier.

Les solutés qui existent sur le marché sont présentés sous deux formes principales : les uns sont contenus dans des emballages de plastique de diverses sortes, les autres dans des emballages de verre, soit en ampoules, soit en flacons munis d'un bouchon.

Diverses expérimentations rendent compte des avantages de ces conditionnements quant à la pollution du liquide qu'ils renferment.

3.2.5.1. Comportement différent des flacons de verre et des récipients en plastique :

Les premiers, GROVES et MAJOR voulurent différencier ces deux modes de conditionnement en réalisant différents comptages de particules à l'aide d'un compteur automatique COULTER sur des solutés de chlorure de sodium à 9 o/oo (100).

Après avoir testé 40 flacons des deux sortes, ils constatèrent qu'il y a dix fois moins de particules dans les récipients en plastique que dans les flacons de verre fermés avec du caoutchouc.

3.2.5.2. Les bouchons de caoutchouc générateurs de particules :

Les responsables principaux de la contamination seraient pour CARVAN et GUNNER (82) constitués par les bouchons de caoutchouc des flacons de verre. Ce sont, en général, des contaminants de surface (fragments) ou de décharge (sels de zinc, siliconés, champignons,....) déjà contenus dans les matières premières servant à leur fabrication.

Pour le prouver, ils ont comparé microscopiquement les dépôts d'impureté provenant de flacons de solutés injectables avec ceux issus d'une suspension obtenue par ébullition pendant une demi-heure de deux bouchons de caoutchouc dans de l'eau distillée préalablement filtrée. Les éléments particulaires étaient qualitativement semblables.

Ils expliquent ce fait parce que, lors de la vulcanisation, le caoutchouc emprisonne des bulles d'air. Au moment de la stérilisation à l'autoclave, sous l'effet de la chaleur et du vide qui se crée dans le flacon, ces bulles se dilatent, provoquant des micro-ruptures de la surface du caoutchouc, libérant ainsi des particules. Durant le stockage, le vide à l'intérieur du flacon continue ce processus, augmentant ainsi le nombre des "poussières".

La présence d'air emprisonné dans le caoutchouc est prouvée par le fait que, lorsque l'on recouvre un bouchon d'eau distillée et qu'on le soumet à une pression de 700 mm de mercure, il laisse échapper de nombreuses bulles d'air pendant plus d'une heure.

Pour vérifier cette hypothèse, GROVES et MAJOR (100) ont effectué des stérilisations répétées de flacons fermés par un bouchon de caoutchouc. Ils s'aperçurent alors que le comptage moyen des particules s'élève avec le nombre de stérilisations.

Reprenant l'hypothèse de GARVAN et GUNNER selon laquelle la principale source de pollution se situerait au niveau des fermetures en caoutchouc, certains fabricants ont laqué ou adjoint une rondelle de plastique à leurs bouchons, ce qui permit d'obtenir une diminution nette des taux de contamination.

Les bouchons en "téflon" libèrent, quant à eux, peu de particules (73, 26).

3.2.6. APPAREILLAGES, MODES DE FABRICATION ET STOCKAGE.

3.2.6.1. Opérations de transfert et de manipulation :

Le transport et la manipulation de produits solides ou liquides durant la fabrication sont générateurs de contaminants particulaires. On peut citer comme exemples :

- l'emploi de pompes et le mouvement des produits dans les conduits en métal, en élastomère ou en matière plastique, libèrent des contaminants particulaires par frottement contre les parois ou par entraînement d'autres polluants déjà présents dans le circuit ;
- l'air comprimé utilisé comme véhicule est contaminant s'il n'est pas filtré convenablement au préalable (poussière, huile ...) ;
- l'emploi du petit matériel de manipulation (pelles, spatules, instruments de mesure, ...) et le mouvement des couvercles des récipients peuvent engendrer des contaminants métalliques par frottement ou au niveau des parties soudées.

Le transport des produits finis, par l'agitation du contenu dans le contenant, entraîne une pollution particulaire par frottement sur les parois. ERNEROT et coll. (73) ont montré que dans les solutés injectables une agitation dans un mélangeur TURBULA de une minute provoque une rapide augmentation du nombre des particules, particulièrement celles de plus petite taille. De même, l'agitation, en se prolongeant, provoque une variation de la distribution en taille des particules : le nombre des grosses particules perd de l'importance par rapport aux petites.

Un transport en automobile de 50 kilomètres durant une heure double approximativement le nombre des particules.

3.2.6.2. Les divers appareillages et procédés de fabrication :

La plupart des machines et des procédés de fabrication sont générateurs de particules. A ce niveau, c'est le phénomène d'usure qui est le plus souvent responsable d'une pollution essentiellement métallique.

Pendant le BROYAGE, des substances résistant à la rupture peuvent provoquer l'usure des marteaux ou des lames du broyeur. Le montage et le démontage continuels des différents éléments de la machine sont générateurs d'éclats et de copeaux, qui se mêlent alors à la substance en cours de broyage.

Le TAMISAGE est aussi une source de contaminants particulaires si l'on utilise des tamis présentant des fissures, des joints ou des bords écaillés.

Au cours des opérations de MELANGE, des contaminants métalliques sont libérés :

- les mélangeurs à lames présentant un jeu inadapté entre ces dernières et les parois provoquent l'apparition de particules ;
- il est courant de voir les galets d'un mélangeur "fondre" au fur et à mesure de leur utilisation.

Le matériel de COMPACTAGE, de GRANULATION, d'ENCAPSULAGE (usure des trémies), peut devenir également polluant. Les granulateurs oscillants sont de gros générateurs de particules, surtout lorsqu'on travaille sur un grain dur.

Le tableau II indique, selon LACHMAN et coll. (146), les types d'impuretés métalliques provenant des diverses phases de fabrication des formes pharmaceutiques solides.

Le SECHAGE d'une poudre ou d'un granulé constitue parfois une source de pollution : plateaux métalliques glissant sur les cadres du séchoir, frottements provoqués dans un lit fluidisé.

L'opération de LYOPHILISATION entraîne parfois la création de débris de verre.

Tableau II : CONTAMINATION PAR DES PARTICULES DE METAL DES FORMES PHARMACEUTIQUES SOLIDES d'après LACHMAN et coll. (146).

TYPE	ORIGINE
Fer.....	Impureté principale dans les matières premières.
Acier inoxydable..	Trouvé le plus fréquemment après les opérations de broyage et de mélange.
Cuivre.....	Trouvé le plus fréquemment après la compression.
Aluminium.....	Décelé le plus fréquemment après l'encapsulage (capsules de gélatine dures).

Le matériel de compression présente de nombreuses sources de contamination par usure des poinçons, des cadres de chargement, par abrasion des cames, des racloirs, d'une manière générale par contact métal-métal.

La présence de particules de cuivre dans des comprimés peut provenir des systèmes d'alimentation des machines à COMPRIMER alternatives munies de sabots ancien modèle à semelles en cuivre.

L'opération d'ENROBAGE favorise particulièrement la contamination par frottement, mais surtout par "collage" de toutes sortes de contaminants si la turbine est mal protégée.

La FILTRATION réalisée à l'aide de filtres dits en profondeur peut être polluante à tous les niveaux, surtout à l'approche du colmatage (222) :

- les filtres dégrossissants fixés à la sortie d'une cuve déchargent dans la solution une importante quantité de fibres. Ceci est également vrai pour les purges d'air, trop souvent protégées par des fibres de coton ;

- de nombreux filtres incorporés dans un circuit "lâchent" souvent des particules et des fibres extraites de leur masse. La source principale, dans ce domaine, est le filtre-plaque fibreux en amiante-cellulose.

Les opérations de CONDITIONNEMENT et de traitement du produit conditionné sont aussi génératrices de particules :

- au cours du remplissage, un mauvais alignement des embouts de remplissage peut provoquer l'arrachage de particules de verre ou de métal. Les opérations de scellage (ampoules) ou de bouchage peuvent être mal conduites et devenir sources de contaminants particulaires ;
- l'AUTOCLAVAGE augmente souvent le nombre de particules. C'est ainsi qu'après stérilisation, il y a un plus grand nombre de particules, et ceci aussi bien dans les récipients en verre que dans ceux en plastique (100, 2, 273)

3.2.7. CONTAMINATION PARTICULAIRE APPARUE LORS DE L'UTILISATION DU MEDICAMENT.

Il peut arriver qu'un nombre considérable de contaminants soit produit au moment de l'utilisation d'un médicament :

- soit lors de l'ouverture du récipient ;
- soit par l'utilisation de divers accessoires d'administration.

3.2.7.1. Ouverture des récipients :

L'exemple le plus connu est la création de nombreuses particules de verre à l'ouverture d'une ampoule.

Ainsi, les vaccins à administrer par voie orale, conditionnés en ampoules en verre, ne sont pas sans danger : le contenu versé sur un morceau de sucre peut être avalé avec des particules de verre plus ou moins grosses, peu visibles, produites lors de

l'ouverture de l'ampoule. Il en est de même pour les collyres en ampoules en verre ou pour un contenant possédant un bouchon difficile à ouvrir ou à percer à l'aide d'une aiguille.

Dans le cas des ampoules injectables, la contamination est encore plus grave, c'est pourquoi, de nombreux auteurs ont étudié ce phénomène : en particulier, TURCO et DAVIS (263) signalent les éclats de verre provenant de l'ouverture à la lime et qui sont en partie aspirés à l'intérieur de l'ampoule par le vide partiel qui y règne.

3.2.7.2. Les accessoires d'administration :

Nombre de particules sont aussi créées au cours de l'utilisation de divers accessoires d'administration de médicaments, tels que perfuseurs avec prise d'air "cotonnée", transfuseurs et surtout seringues en verre avec piston métallique (14, 44).

En 1967, HO, CHURCH et LEE signalent la présence de particules dans les trousses d'administration (119) ; de même, WILLIAMS et BARNETT (286).

A plusieurs reprises, l'équipe belge de ROLAND étudie ce problème (216, 278) et est amenée, lors de son deuxième travail, à adopter une position qui a évolué. En 1969, en analysant la pollution particulaire liée à l'utilisation de ces accessoires, elle avait estimé que leur responsabilité était relativement faible. En effet, la contamination totale restait toujours inférieure à 1.000 particules par trousse, alors que les solutés de perfusion conditionnés en flacons de verre pouvaient véhiculer eux-mêmes 3.000 à 12.000 particules. Mais le jugement porté était comparatif, et les solutions analysées à l'époque devraient être considérées, aujourd'hui, comme étant trop contaminées ; en effet, en 1970, DAVIS (55) rapportait déjà que les trousses pouvaient doubler le nombre de particules présentes dans la solution. Au cours de ses essais, il utilisait des flacons dont la pollution de base était plus faible que celle observée par l'équipe belge : de 200 à 2.000 particules. Or, les contaminants introduits par la trousse étaient généralement inférieurs à 1.000, sauf dans un cas où le taux de pollution approchait 7.000 particules par trousse.

De nos jours, la qualité des solutés s'étant améliorée, nous devons reconnaître que le taux de pollution pourrait être facilement doublé ou quadruplé si la fabrication des accessoires n'évolue pas parallèlement à celle de la préparation des injectables.

Dans certains services hospitaliers, des seringues en verre munies d'un piston de verre ou d'un piston métallique sont encore utilisées sur une très large échelle. La conception même du matériel implique une abrasion entre les deux éléments, et ces accessoires peuvent libérer de très nombreuses particules de verre.

ERNEROT et SANDELL (76) ont étudié la libération de particules par quatre seringues en verre et deux en plastique. Un seul de ces six types de seringues, en plastique, avait un niveau de contamination faible, sans particules supérieures à 3 µm. Ils attribuèrent ces particules au verre et au joint du piston.

En 1969, ROLAND et coll. (216) considéraient les seringues en plastomère à usage unique comme relativement peu polluées par rapport aux solutés (200 à 400 particules par seringue contre 3.000 à 12.000 par flacon). Actuellement, une injection à l'aide d'un matériel de cette qualité doublerait les particules présentes dans un soluté.

Ces auteurs se montrent surpris par le nombre d'éléments cédés par des seringues en verre neuves par rapport aux contaminations que provoquent les seringues en plastomère à usage unique, confirmant ainsi les observations de ERNEROT et SANDELL. La pollution totale est facilement décuplée pour des volumes normaux de 5 et de 10 ml. Lors d'une première utilisation, une seringue en verre peut libérer une quantité totale de particules du même ordre de grandeur que ce qui est présent dans un flacon de perfusion de qualité moyenne, et très nettement supérieure à la contamination introduite par les trousses ou par les seringues en matière plastique. Le degré d'usure joue un rôle primordial dans cette pollution : la contamination par les seringues à usage multiple va en s'amenuisant au cours du temps, mais des valeurs comparables à celles des seringues en matière plastique ne sont atteintes qu'après une centaine de manipulations.

Et nous n'avons pas évoqué, jusqu'ici, la contamination accidentelle par le personnel infirmier et par l'environnement. Ainsi, à quoi bon faire la chasse aux particules si les aiguilles à utiliser sont stérilisées dans un tube en verre recouvert d'un tampon d'ouate ?

Dans les meilleurs hôpitaux, les infirmières appelées à utiliser en plusieurs injections le contenu d'une ampoule - cas trop fréquent en pédiatrie - en referment le col avec un sparadrap ou avec un tampon de gaze ou d'ouate. Le coton stérile est d'ailleurs largement utilisé au niveau des services de soins pour nettoyer, sécher et emballer le matériel d'administration, pratique qui a déjà été dénoncée par SARRUT et NEZELOFF (227).

Les polluants sont parfois de l'ordre du millimètre. Trop souvent, l'argument évoqué pour sous-estimer le risque de leur présence est de dire qu'ils ne traverseront sans doute pas l'aiguille d'injection. En fait, le passage de ces fibres à travers une aiguille fine ne dépendra que de la dimension sous laquelle elles se présenteront.

L'amélioration de la qualité des solutés sera compromise si, dès à présent, un effort n'est pas porté sur la fabrication des accessoires (trousses, seringues) et des additifs.

Ces considérations indiquent clairement que, même si l'industrie arrivait à une pollution particulaire très faible, voire même à une pollution nulle, le problème ne serait que partiellement résolu. L'objectif ultime : la protection du malade, ne serait pas encore atteint.

4. CONSEQUENCES DE LA CONTAMINATION PARTICULAIRE DES MEDICAMENTS

Elles portent essentiellement sur trois points :

- les caractères organoleptiques ;
- la stabilité ;
- l'innocuité.

4.1. CONSEQUENCES SUR LES CARACTERES ORGANOLEPTIQUES -

Il est évident que tout médicament non fabriqué dans des conditions d'hygiène optimales verra ses caractères organoleptiques modifiés : goût, saveur, odeur et aspect.

C'est ainsi que, comme nous venons de le voir, des dragées confectionnées en atmosphère peu propre ont une surface "piquée" par toutes sortes de contaminants particulaires (poussières, fibres, fragments d'insectes).

4.2. CONSEQUENCES SUR LA STABILITE -

Certaines contaminations particulaires peuvent influer sur la stabilité des médicaments en modifiant leur composition ou en les altérant (troubles, dépôts, précipitations, coloration par production de pigments, décoloration, modification du pH, oxydation, réduction, isomérisation (13).

Il en résulte une accumulation de produits résiduels qui entraînent parfois des changements importants du milieu et des dégradations des principes actifs

4.3. CONSEQUENCES SUR L'INNOCUITE DU MEDICAMENT -

4.3.1. INTRODUCTION.

Les publications consacrées à ce sujet ont fait l'objet de plusieurs travaux de synthèse : VRANCKX et coll. (278), DAVIS et coll. (55), ARAUD (9), TURCO et coll. (261, 262, 265), ERALY (27).

Avant toute chose, les risques de la pollution par les particules doivent être définis. D'une façon générale, nous les connaissons moins par des données cliniques que par des données expérimentales et des présomptions d'effets pathogènes.

Les particules peuvent provoquer soit des accidents majeurs aigus, ce qui est très rare (1, 40, 237), soit des inconvénients légers, ce qui est le cas général, soit des risques à longue échéance, très difficiles à mettre en évidence avec certitude.

4.3.2. FACTEURS DONT DEPEND LE RISQUE.

Les risques liés à l'administration de médicaments contaminés par des particules vont dépendre de trois groupes de facteurs :

- le nombre de particules administrées ;
- la forme galénique et la voie d'administration ;
- la nature et les diverses caractéristiques des particules.

4.3.2.1. Le nombre des particules administrées :

Il est lié au taux de contamination du médicament, à la quantité administrée ainsi qu'à la durée du traitement. On peut schématiser de la façon suivante : lorsque les particules sont introduites dans l'organisme, ce dernier met en jeu un certain nombre de moyens de défense ; ces moyens peuvent être mis en défaut, et on notera alors l'apparition de processus pathologiques.

4.3.2.2. La forme galénique et la voie d'administration :

Toutes deux sont étroitement liées, mais c'est surtout la voie d'administration qui détermine le risque.

De prime abord, il semble que l'on puisse penser que la voie digestive et la voie locale sont, en règle générale, peu dangereuses, contrairement à la voie parentérale.

La forme galénique la plus concernée est donc naturellement la forme injectable, principalement lorsqu'il s'agit de grands volumes de solutés massifs tels qu'ils sont employés en réanimation.

La forme injectable n'est cependant pas la seule en cause. Les collyres et pommades ophtalmiques peuvent devenir très dangereux s'ils contiennent des particules de verre ou de métal (13).

Il faut signaler également que le risque ne se manifeste pas toujours au niveau de la voie d'administration prévue pour chaque forme pharmaceutique. C'est ainsi que le talc, produit d'application locale, peut être à l'origine d'un risque respiratoire s'il est contaminé par de l'amiante. De même, un liquide pressurisé, appliqué sur les muqueuses pharyngées, peut induire un risque respiratoire s'il a été filtré sur amiante et a entraîné des fibres.

4.3.2.3. La nature et les diverses caractéristiques des particules :

La forme et la nature physico-chimique des particules jouent un rôle.

C'est ainsi, par exemple, que la toxicité particulière des formes fibreuses est bien établie, [illegible] minérales comme l'amiante.

4.3.2.4. La taille des particules :

L'action de la taille des particules sur leurs effets pathogènes ne peut être comprise que si l'on se rappelle le mécanisme de l'appareil circulatoire.

Du fait même du rôle du système circulatoire qui parcourt tout l'organisme, l'injection de particules aura des conséquences diverses se manifestant en différents sites. L'appareil circulatoire est un circuit fermé dans lequel les poumons agissent comme un filtre constitué d'un immense lit de capillaires dont le diamètre le plus petit est environ celui d'un érythrocyte (5 à 15 µm). On doit donc se demander quelles sont les particules qui peuvent passer au travers de ce filtre pulmonaire, et quelles sont celles qui s'y arrêtent.

PRINZMETAL et coll., cités par GROVES (98), ont démontré expérimentalement que des particules de verre jusqu'à 390 µm peuvent gagner la circulation systémique après être passées dans les poumons.

Lorsqu'une particule est retenue dans le lit capillaire pulmonaire, elle peut ne produire aucune manifestation pathologique, tant que la circulation collatérale du territoire intéressé reste suffisante, ce qui est le plus souvent le cas. Si elle devient insuffisante ou nulle pour compenser les capillaires obstrués dans un territoire donné, l'irrigation des tissus ne se fera plus et on observera une ischémie locale se manifestant soit par la nécrose des territoires mal ou non irriguéé, soit par des micro-embolies pulmonaires, thromboses et granulomes secondaires, ce qui, de toute manière, détermine une réduction des possibilités fonctionnelles de l'organe.

De telles éventualités au niveau du poumon ne portent pas toujours à conséquence (à moins que l'innondation par les particules soit massive et prolongée) en raison de l'immense surface du lit capillaire pulmonaire et des possibilités de circulation collatérale. Le danger des embolies au niveau du poumon semble donc moindre qu'au niveau des autres organes.

Les particules inférieures à 390 µm, qui peuvent franchir les capillaires pulmonaires, atteignent la grande circulation. Elles pourront, au mieux, aller se perdre dans les mailles du système réticulo-endothélial et, au pire, occasionner des occlusions de petits vaisseaux dans différents organes. Les conséquences en sont autrement plus graves au niveau de la circulation cérébrale, rénale ou rétinienne.

En ce qui concerne le verre, GARDNER et CUMMINGS, cités par GROVES (98), montrent que la majorité des grandes particules se logent dans les capillaires pulmonaires, les particules de taille moyenne (inférieures à 10 µm) dans la rate et les modules lymphatiques, et les particules fines (inférieures à 1 µm) dans le foie.

On peut donc penser que les particules de grande dimension, du moins en ce qui concerne la voie parentérale, ne sont pas forcément les plus nocives dans la plupart des cas puisqu'elles seront arrêtées par le poumon qui, de par sa structure et sa fonction, est le plus apte à supporter leur agression et à les éliminer.

4.3.2.5. Cas particulier de l'amiante :

L'amiante est sans doute la meilleure illustration du rôle de la forme, de la taille et de la nature physico-chimique des particules. Nous avons vu précédemment dans quelles circonstances on pouvait rencontrer de l'amiante dans les produits pharmaceutiques. La toxicité de l'amiante paraît liée non pas tellement à sa structure chimique, mais essentiellement à sa forme fibreuse. Comme la plupart des fibres, ce minéral présente une toxicité par action mécanique (104). A l'heure actuelle, il n'est pas encore possible de déterminer avec certitude quelle est la taille de fibre la plus dangereuse, les travaux réalisés aboutissant à des résultats assez contradictoires.

Le risque asbestosique, lors de l'administration des médicaments, peut se manifester à quatre niveaux :

- au niveau de la voie respiratoire, par l'utilisation de poudres ou d'aérosols contaminés ;

- au niveau de la voie locale, lors de l'application de talcs ou produits contaminés ;
- au niveau de la voie digestive, par ingestion de formes solides contenant des talcs contaminés, de formes liquides filtrées sur amiante ;
- au niveau de la voie parentérale (110).

En ce qui concerne la VOIE RESPIRATOIRE, le risque que représente l'amiante est unanimement reconnu. A forte concentration dans les ambiances industrielles, il détermine l'asbestose ou fibrose pulmonaire. L'action cancérogène peut se manifester après 15 à 25 ans de latence par des mésothéliomes pleuraux (38, 104).

De même, les populations exposées à l'amiante présentent un risque élevé de cancers pulmonaires, se manifestant de 10 à 40 ans après la première exposition.

Bien que le risque asbestosique au niveau de la VOIE DIGESTIVE soit contesté, différents travaux laissent entrevoir la possibilité de cancers gastro-intestinaux (50, 169).

4.3.3. HISTOPATHOLOGIE DES LESIONS DUES AUX PARTICULES.

Blocage direct d'un vaisseau sanguin avec facilitation de la coagulation intra-vasculaire, formation d'embolies, réactions antigéniques, artérites à cellules géantes, et surtout granulomes causés par des corps étrangers dans les artères pulmonaires, sont les suites possibles de l'introduction de particules dans la circulation sanguine.

D'une manière générale et quelle que soit la voie d'effraction, l'introduction dans l'organisme de corps étrangers provoque l'apparition d'une réaction inflammatoire macrophagique, caractérisée histologiquement par la présence d'un granulome.

L'ASPECT HISTOPATHOLOGIQUE des lésions provoquées par les FIBRES DE COTON est décrit par PAGES (191). Il distingue trois stades différents, mais que l'on peut rencontrer chez un même sujet :

- au niveau de l'endartère, il constate une altération de la cellule endothéliale avec apparition de cellules géantes plurinucléées ;
- le granulome gigantocellulaire se propage vers la media en repoussant les fibres élastiques et musculaires. Celles-ci se reconstituent après le passage du granulome ;
- celui-ci poursuit sa progression vers l'extérieur du vaisseau. L'adventice est repoussée, puis traversée par l'ensemble corps étranger - cellules inflammatoires.

En conclusion, sous l'action combinée des cellules géantes et de la pression sanguine, le corps étranger est éliminé à travers la paroi vasculaire et vraisemblablement drainé par le système lymphatique.

4.3.4. PREUVES DES EFFETS PATHOGENES DES PARTICULES PRESENTES DANS LES FORMES INJECTABLES.

Bien que aucun dommage n'ait jusqu'ici causé la mort d'un patient, de nombreux chercheurs, aussi bien par des expériences sur l'animal que par l'autopsie de patients qui, avant leur mort, avaient reçu en intraveineuse de grandes quantités de liquides pollués, ont parfaitement mis en évidence ces modifications pathologiques dues aux particules étrangères. Nous nous proposons de passer ces divers travaux en revue.

4.3.4.1. Preuves apportées par la clinique humaine :

Deux cas doivent être nettement distingués en fonction des voies d'administration (216) :

- les risques de l'injection intra-artérielle ;
- ceux de l'administration intra-veineuse.

4.3.4.1.1. Injections intra-artérielles :

Elles sont réalisées essentiellement à l'occasion d'examens paracliniques, lesquels sont de plus en plus pratiqués de nos jours. Un certain nombre d'accidents spectaculaires ont été rapportés à l'occasion d'artériographies pratiquées avec des solutions polluées par des particules étrangères.

SILBERMAN (237) rapporte, en 1960, 5 cas d'embolies cérébrales où il observe la présence de particules dans les sites cérébraux au cours d'autopsies de 5 sujets ayant subi des angiographies cérébrales. D'une épaisseur de 10 à 20 µm, les fibres responsables avaient une longueur de 80 à 200 µm et furent retrouvées à l'examen anatomo-pathologique.

Dans deux de ces cas, il y a au niveau des artérioles cérébrales une importante réaction à corps étrangers, telle que le granulome a complètement obstrué les artères et provoqué un infarctus cérébral par ischémie.

Dans ces cas, le MECANISME DE POLLUTION du liquide d'injection se fait par l'intermédiaire de la solution saline qui sert à rincer les seringues et le cathéter d'injection. En effet, le soluté est mis dans une cupule à ciel ouvert, l'opérateur utilise des compresses en général déposées sur la même table que la cupule ; celles-ci libèrent des fibres très fines dans l'air ambiant et un certain nombre de particules retombent dans la cupule, polluant le soluté salé. On a exclu la possibilité de pollution du liquide de contraste employé.

De même, CHASON (40) rapporte 10 cas d'EMBOLIES CEREBRALES par fibres de coton après une ANGIOGRAPHIE CAROTIDIENNE chez l'homme. Les fibres ont une épaisseur de 10 à 20 µm et une longueur de 80 à 200 µm.

La contamination avait d'abord été attribuée aux tampons d'ouate avec lesquels les aiguilles étaient essuyées avant usage, mais la suppression de cette pratique n'empêcha pas le retour d'accidents ultérieurs. La responsabilité des lésions fut, finalement, attribuée à la solution physiologique additionnée d'héparine qui servait à irriguer les cathéters et qui était administrée à partir d'un récipient ouvert, ce qui rendait possible toute contamination externe.

Des accidents similaires furent rapportés par ADAMS et coll. (1) qui décrirent quatre cas d'EMBOLIES RENALES par fibres de coton à la suite d'ARTERIOGRAPHIES. La solution saline additionnée d'héparine qui servait à l'irrigation des cathéters était contenue dans un récipient ouvert, contaminé par des fibres.

Dans les trois cas, on a retrouvé à l'autopsie de larges zones infarcies au niveau des reins. Après concentration de la solution saline, la nocivité du liquide a pu être démontrée expérimentalement.

La plus grande prudence s'impose donc pour les liquides utilisés par voie intra-artérielle, et notamment pour les produits de contraste.

4.3.4.1.2. Voie intra-veineuse :

Par contre, les effets délétères des particules administrées par voie INTRA-VEINEUSE à l'être humain sont plus difficiles à mettre en évidence. Une corrélation entre les altérations vasculaires ou pulmonaires limitées, mais cumulatives, et la présence de particules étrangères, ne peut pas toujours être établie au cours du traitement. Les risques de toxicité chronique restent toutefois appréciables, autant chez les polyperfusés et les polytransfusés. L'action des particules injectées est, comme nous l'avons déjà dit, fonction de leur taille et de l'endroit de fixation dans le système vasculaire où elles provoquent un colmatage plus ou moins prononcé. Elle dépend aussi de la réponse du tissu atteint, mais des incidents, même mineurs, sont rarement apparents au cours du traitement. Des altérations ont été observées au cours d'autopsies de malades ayant reçu de grands volumes d'intra-veineuses. Généralement, elles se caractérisent par des réactions inflammatoires macrophagiques.

Mais, en général, les risques de la voie intra-veineuse ne sont pas CLINIQUEMENT aussi évidents que ceux de la voie intra-artérielle.

Lors d'autopsies systématiques de malades, VON GLAHN, en 1949, (277) examine régulièrement sur une période de dix ans des coupes pulmonaires et constate alors la présence de granulomes inflammatoires au niveau des plus petites ramifications des ARTERES PULMONAIRES. Devant la grande fréquence de cas rencontrés chez des malades ayant subi avant leur mort des traitements

médicaux intenses par voie INTRA-VEINEUSE, cet auteur, le premier, pense à rapprocher la présence des réactions à corps étrangers d'une possible contamination intra-veineuse ayant comme support les liquides parentéraux.

Le trait commun de tous les malades présentant des granulomes pulmonaires est en effet qu'ils ont reçu, dans une période n'excédant pas dix jours avant leur mort, des perfusions ou des transfusions sanguines. Soupçonnant, d'après la forme des corps étrangers contenus les granulomes, qu'il s'agit de fibres de coton, lesquelles proviendraient de fibres de gaze intercalées dans les tubulures des trousses de transfusion, l'auteur a vérifié et étudié les lésions que celles-ci peuvent produire dans l'organisme en faisant une expérimentation chez le rat. Les fibres de coton sont injectées dans les veines iliaques, elles vont se loger dans les artères pulmonaires où elles provoquent une réaction macrophagique typique.

JAQUES (130), sur une étude statistique, a mis en évidence la corrélation entre le nombre d'actes médicaux et le nombre de granulomes pulmonaires observés par unité de surface. Ainsi, le plus grand nombre de granulomes intra-vasculaires a été trouvé dans les poumons de malades qui avaient reçu la plus importante quantité de liquides par voie parentérale et avaient subi des interventions dans la sphère crânio-cérébrale. Le plus petit nombre de lésions a été trouvé chez des malades qui avaient reçu la plus petite quantité de liquides et avaient subi des interventions de chirurgie générale.

En examinant au microscope des coupes pulmonaires de 210 enfants décédés, à la recherche de corps étrangers, BRUNNING, cité par ARAUD (9), constate que 150 d'entre eux ont reçu des liquides par voie INTRA-VEINEUSE. Il ne retrouve que dans 12 % des cas des lésions évidentes au niveau des poumons ; les corps étrangers sont intra-artériels. Il émet, au départ, l'hypothèse qu'il s'agit de substances médicamenteuses micro-cristallines, éventuellement modifiées par une réaction de l'organisme, en se basant sur le fait que les substances, au centre du granulome, sont biréfringentes, caractéristique microscopique des structures cristallines. Mais ce caractère biréfringent est également une propriété des fibres végétales, et il en vient à dire qu'il s'agit de fibres de cellulose en raison de la forme allongée et du centre clair.

Une des meilleures études anatomo-pathologiques est due à SARRUT et NEZELOFF (277) qui découvrirent en 1960, chez 25 prématurés, des lésions pulmonaires exclusivement artérielles, caractérisées par des réactions macrophagiques développées autour de fibres microscopiques de coton provenant principalement de sol[illegible]tés pour PERFUSIONS et de TRANSFUSIONS administrées auparavant à ces prématurés. La contamination des produits injectables se serait faite au cours des manoeuvres de nettoyage et de stérilisation des flacons et de tout le matériel d'injection (aiguilles et seringues) ; avant la stérilisation, les récipients en verre étaient recouverts de coton cardé entouré de gaze, dont la friabilité était accrue par le chauffage.

Dans l'ensemble, les artérites pulmonaires macrophagiques semblent bien tolérées et ne pas devoir être mises en cause quant à la mort de ces enfants.

Ces auteurs ont mis en lumière les énormes possibilités d'épuration par les surfaces endothéliales des vaisseaux, particulièrement au niveau pulmonaire. Dans l'ensemble, les artérites macrophagiques observées semblaient bien tolérées et l'origine du décès des enfants a été attribuée à des maladies infectieuses. Mais le rôle pathologique de ces lésions ne peut pas être exclu à priori, bien qu'elles soient discrètes et apparemment transitoires.

Les particules étrangères sont des sources potentielles de micro-embolies, de thromboses et de granulomes, et elles constituent une nuisance intra-veincuse que nous devons supprimer ou, du moins, diminuer le plus possible.

4.3.4.2. Expérimentation animale :

De nombreux auteurs se sont attachés à prouver expérimentalement sur l'animal la toxicité de l'injection de particules dans l'organisme (86).

Déjà VON GLANN (cité plus haut) - (277), pour vérifier son impression que les fibres vues au microscope au cours d'examens histopathologiques proviennent des liquides de perfusion, injecte une suspension de fibres de coton dans les veines iliaques de RATS. Une seule injection suffit pour reproduire les lésions artérielles pulmonaires constatées en pathologie humaine.

STEHBENS et FLOREY (246) constatèrent, après l'injection intra-veineuse dans l'oreille du lapin d'une suspension de particules dont la taille varie de 2 à 5 µm, l'agglutination de plaquettes auxquelles viennent adhérer les corps étrangers ainsi que des éléments figurés du sang : érythrocytes et leucocytes. Ils observent que la masse ainsi formée se déplace et va obstruer certains petits vaisseaux.

Compliquant le protocole expérimental, WARTMAN (282) introduit par voie intra-veineuse chez des LAPINS une suspension dans du soluté salé de fibres de papier filtre, puis un mélange de fibrine humaine et de papier filtre, et enfin une suspension de papier filtre et de sang complet de lapin. Les résultats montrent que le papier filtre peut s'entasser et boucher l'origine d'un petit vaisseau pulmonaire, ou bien adhérer à la paroi, toujours d'une artériole pulmonaire, en produisant une artérite intense. Alors que l'artérite tend à s'estomper, l'embole s'organise et laisse une cicatrice faisant hernie dans la lumière du vaisseau, réduisant le courant sanguin.

GARVAN et GUNNER (84), dont les travaux font autorité en la matière, ont prouvé la formation de nodule dans les poumons du lapin après injection d'une solution contenant des corps étrangers dans la veine marginale de l'oreille, et ont dénombré chez le lapin près de 5.000 granulomes disséminés dans les deux poumons pour chaque demi-litre de liquide intra-veineux injecté.

Si les particules proviennent du papier filtre, elles causent d'intenses artérites suivies d'embolies, les particules de silice sont responsables de granulomes et d'une vaso-constriction réflexe dans les poumons.

GROSS (92) a montré que les particules solides (de papier, de caoutchouc, de matière plastique, ...) en suspension dans les solutés à usage intra-veineux, injectés à des chiens, provoquent une inflammation granulomateuse, dans les poumons notamment.

Les corps étrangers qui provoquent une réaction au niveau des artérioles pulmonaires sont progressivement éliminés par l'organisme. Ainsi, CAZAL, cité par ARAUD (9), introduit par voie intra-veineuse, chez

des LAPINS, une suspension de paillettes de verre provenant de flacons défectueux. Les injections sont répétées plusieurs fois de suite et l'autopsie des animaux est précoce ou retardée.

A l'examen microscopique, il constate la présence de paillettes dans les artérioles pulmonaires, et non dans les autres viscères, lorsque l'autopsie est précoce. L'animal sacrifié 35 jours après la dernière injection présente un poumon normal. L'élimination des paillettes est rapide et se fait sans séquelles.

ARAUD et coll. (9, 10) démontrent que l'injection à des lapins de solutés nettement pollués par des particules (injections faites dans les conditions de réanimation post-opératoire habituelle chez l'homme) provoque une montée de la courbe thermique et qu'ainsi la présence des particules rendait ces solutés pyrogènes.

4.3.5. CONCLUSION.

- Malgré tous les exemples cités, les effets défavorables de la présence de contaminants particulaires dans les médicaments sont difficilement décelables, et il faudra encore plus d'informations irréfutables sur ces effets en expérimentation animale et en clinique, spécialement chez les malades âgés, les nourrissons et les personnes atteintes d'affections pulmonaires ou gastriques.

Mais il est certain que pour assurer le haut niveau d'innocuité des médicaments exigé par les autorités responsables, il faut éliminer des préparations pharmaceutiques le plus d'éléments indésirables possibles, dont les contaminants particulaires.

5. LEGISLATION ET NORMALISATION

5.1. CONSIDERATION PARTICULIERE DES PHARMACOPEES INTERNATIONALES : LA POSITION DES PHARMACOPEES -

Les pharmacopées, si sévères pour la pureté chimique, la stérilité, l'absence de pyrogènes, l'étanchéité des récipients et leur indifférence vis-à-vis du soluté, se contentent dans leur grande majorité d'exiger la limpidité des solutés injectables. Les critères d'appréciation de la limpidité sont d'ailleurs, le plus souvent, peu précis. Ainsi, nous trouvons à la Pharmacopée Française de 1965, page 882 :

> "Les solutions injectables préparées à l'avance
> "doivent être limpides, et un examen visuel
> "réalisé dans les meilleures conditions d'ob-
> "servation ne devra pas permettre de déceler
> "la présence de particules en suspension".

Ces tests de limpidité, décrits pour la première fois en 1915 dans l'USP IX (241) sous le nom de "test de clarté" (clarity test), sont présents dans la plupart des pharmacopées, décrits avec plus ou moins d'indications techniques concernant leur réalisation.

Etant donné que ces tests sont réalisés par l'observation des solutés à l'oeil nu, il sera difficile, dans de telles conditions, d'observer les particules de moins de 50 µm. La Commission de la S.F.S.T.P., qui étudia le problème des particules dans les solutés injectables (241), rapporte que le "test de clarté" de la Pharmacopée Américaine a été au centre d'une querelle légale qui opposa les laboratoires BRISTOL à la Food and Drug Administration. A cette occasion, le juge releva justement qu'un test de ce genre ne pouvait pas être retenu comme test légal, étant trop subjectif.

Pour illustrer ces propos, nous avons représenté sous forme de tableau les indications des principales pharmacopées (13, 239, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 195, 194, 179, 270, 271).

Tableau III.

PHARMACOPEE	CONTAMINATION PARTICULIERE RECHERCHEE	METHODE	REMARQUES DIVERSES
Belge 1962.....	+	examen visuel	méthode d'examen décrite
Helvétique 1972..	+	examen visuel	
Internationale II	0	0	
Européenne II....	+	examen visuel	méthode décrite
DAB 7/DDR.....	+	examen visuel	examen exigé sur échantillonnage méthode directe
Française VIII...	+	examen visuel	
Française IX.....	0	0	
B.P.C. 73.....	+	examen visuel	
B.P. 73.....	+	comptage automatique	normes limites méthode décrite
U.S.P. XIX	+	comptage micros-copique	normes limites méthode décrite
Italienne 1973...	+	examen [illegible]	

On constate que deux ouvrages officiels seulement évoquent un niveau chiffré de pollution limite, tandis que les autres pharmacopées ou bien passent le problème sous silence, ou bien proposent un test se référant à l'appréciation de l'opérateur.

La Pharmacopée Britannique (Appendix XVIC A 123) - (195) - précise que :

> "L'appareillage à utiliser doit être un instru-
> "ment capable de compter le nombre de parti-
> "cules ayant l'équivalence d'une sphère de
> "diamètre égal ou supérieur à 2 µm, ou égal ou
> "supérieur à 5 µm. Le nombre de particules pour
> "1 ml de solution ne doit pas excéder 1.000
> "pour celles mesurant 2 µm et plus, et 100 pour
> "celles mesurant 5 µm et plus".

Faisant ainsi appel aux compteurs automatiques, la Pharmacopée Britannique se montre très en avance sur les autres pharmacopées.

De même, le supplément de l'USP XIX (271) établit également des limites basées sur une technique de comptage manuel sur membrane de filtration en microscopie optique ; elle préconise :

> "moins de 50 particules par millilitre, de
> "taille supérieure ou égale à 10 µm" ;
>
> "moins de 5 particules par millilitre, de
> "taille supérieure ou égale à 25 µm".

Par contre, il semble que ni la Pharmacopée Française, ni la Pharmacopée Européenne, ne prévoient de tels contrôles quantitatifs.

Il suffit donc que le soluté paraisse limpide lors d'une inspection visuelle pour qu'il soit déclaré apte à l'utilisation. Il apparaît donc que la décision définitive est à la charge du pharmacien responsable de la fabrication.

Il semble cependant important de fournir aux fabricants des critères précis de contrôle, ainsi que l'ont fait les Pharmacopées Britannique et Américaine. Dans cette optique, un grand nombre de travaux visant à établir des normes et des standards ont été réalisés et ont pu aboutir à diverses recommandations.

5.2. LES EFFORTS DE NORMALISATION -

5.2.1. DIFFICULTES D'ETABLIR DES NORMES DE CONTAMINATION PARTICULAIRE.

Dans le domaine de la contamination particulaire, l'établissement de normes limites est un élément fondamental du contrôle du niveau de pollution. C'est pourquoi il faut s'efforcer de proposer des normes en fonction de données scientifiques, afin d'avoir à sa disposition des critères de choix objectifs.

Dans la pratique, on constate que les normes qui sont proposées de part et d'autre sont le plus souvent issues de l'expérience et ont un caractère inévitablement arbitraire.

Tous les auteurs s'accordent pour signaler les difficultés de normalisation dans le domaine de la contamination particulaire. Ces difficultés sont liées essentiellement à trois points :

- la diversité des formes et présentations des médicaments ;
- la diversité des techniques d'étude ;
- la connaissance relative de la pathologie des particules.

5.2.1.1. Difficultés liées à la diversité des formes et des médicaments :

Il faut, dans un premier temps, signaler qu'une forme solide et une forme liquide sont très différentes, et donc ne peuvent se voir appliquer des normes semblables.

A titre d'exemple plus particulier, pour mieux comprendre les difficultés de normalisation des particules dans les solutés injectables, il faut envisager leur grande diversité de présentation.

Si l'on fait un classement par volume, nous trouvons en effet :

- les solutés massifs (formes pharmaceutiques destinées aux perfusions intra-veineuses), nutritifs ou de rehydratation, présentés dans des flacons de 1.000 ml, 500 ml, 250 ml et 125 ml, ou en poches plastiques ;

- les volumes que nous qualifierons de moyens : ce sont les flacons supérieurs à 5 ml et inférieurs à 125 ml ;
- enfin, les petits volumes inférieurs à 10 ml : ampoules et seringues prêtes à l'injection.

De même, le conditionnement peut être prévu pour des modes d'utilisation différents : conditionnement en dose unique ou, plus exceptionnellement, en multidose.

Dans la pratique, il apparaît souvent difficile d'appliquer des normes de contrôle identiques pour l'ampoule de 2 ml et pour le flacon de 250 ml ou 500 ml.

5.2.1.2. Difficultés d'application aux techniques d'étude :

Nous verrons, dans le deuxième chapitre de ce travail, que depuis une vingtaine d'années on a observé la mise au point et le développement d'un grand nombre de méthodes d'étude des particules. Ceci a eu pour conséquence de permettre aux chercheurs de proposer des méthodes modernes pour suppléer les méthodes anciennes des pharmacopées.

Cependant, en raison de la grande diversité de ces techniques, il est rapidement apparu un certain manque d'homogénéité dans les résultats, ce qui rend la plupart des comparaisons entre ces méthodes délicates.

C'est ainsi qu'un article de [illegible], [illegible] et DAVIS (15), paru en 1973, contient l'affirmation que les efforts qui ont été réalisés jusqu'à cette date pour fixer des limites à la contamination particulaire ont dans l'ensemble échoué en raison de ce manque d'homogénéité dans les méthodes d'étude.

Nous aurons l'occasion de revenir, dans le deuxième chapitre, sur l'évaluation de ces méthodes de numération.

Pour le moment, contentons-nous de dire qu'il ne peut y avoir de bonne norme que si elle est accompagnée d'indication de méthode, et qu'il ne peut y avoir de norme utile que si l'on sait restreindre au minimum les méthodes employées.

5.2.1.3. Difficultés liées à la méconnaissance de la pathologie des particules :

Nous avons vu, dans le paragraphe 5 consacré aux effets de la contamination particulaire, que si la pathogénicité des particules était bien établie, il était difficile cependant, voire impossible, d'établir un lien entre la quantité de particules administrées à l'occasion d'un traitement et l'effet pathologique.

Se basant sur ce fait, un certain nombre d'auteurs ont estimé qu'il était inutile ou plutôt prématuré de fixer des normes tant que l'on n'aurait pas de notions plus précises sur les effets pathologiques des particules.

Ainsi, ROLAND (216) indique :

> "Pour établir rationnellement des normes, il faut
> "d'abord définir sans ambiguïté les risques pour
> "le malade et préciser la quantité de polluant
> "tolérable pour l'organisme humain".

De leur côté, TURCO et DAVIS (268) adoptent une position inverse et prédisent, en 1973, que des organismes normalisateurs établiront des normes pour les matières particulaires dans les produits injectables en dépit du manque d'études contrôlées sur les humains. Ce même DAVIS, dans un éditorial (52) de 1973, du "Hospital Pharmacy", admet cependant la nécessité de recherches complémentaires pour fixer des limites acceptables de dimension et de nombre de particules.

Il semble donc que les normes que l'on est en mesure de proposer actuellement ne peuvent être que transitoires et destinées à évoluer, d'une part, avec la meilleure connaissance de la pathologie des particules, d'autre part, avec les progrès techniques réalisés aussi bien dans le domaine de la mesure de la contamination que dans celui de sa prévention ou de son élimination. En effet, il est souhaitable que toute norme qui possède par elle-même un caractère contraignant soit compatible avec le développement industriel pour pouvoir être acceptée et respectée.

5.2.2. LES PRINCIPALES TENTATIVES DE NORMALISATION DE LA CONTAMINATION PARTICULAIRE.

Pour le moment, il existe peu de normes de contamination particulaire dans l'Industrie Pharmaceutique, mais en l'absence d'expérience, il reste la possibilité d'adopter celles en usage ailleurs, quitte à les modifier en fonction des résultats pratiques obtenus. Voici quelques exemples de ces limites (102) :

- pour l'air des locaux industriels propres : 4.000.000 de particules par m^3 d'air, de taille supérieure à 0,5 µm, dont 25.000 supérieures à 5 µm ;
- pour les liquides utilisés dans les moteurs d'avions ou de fusées : 4 mg pour 100 cm^3 de liquide ;
- pour les liquides hydrauliques propres : 12.500 particules supérieures à 5 µm par cm^3, dont 10 supérieures à 100 µm ;
- pour les vêtements dits "propres" : 2.500 particules supérieures à 5 µm par dm^2, dont 18 fibres.

Nous verrons successivement ce qui a été fait dans l'Industrie Pharmaceutique :

- pour les atmosphères de travail ;
- pour les diverses formes pharmaceutiques non parentérales ;
- pour les récipients et accessoires d'administration ;
- pour les préparations injectables ;
- puis, dans le cas particulier de l'amiante.

5.2.2.1. Les atmosphères de travail dans l'Industrie Pharmaceutique :

A l'heure actuelle, mis à part les ambiances à flux d'air laminaire, il n'existe pas, dans l'Industrie Pharmaceutique, de normes de contamination des atmosphères de travail.

5.2.2.2. Les diverses formes pharmaceutiques non parentérales :

Depuis quelques années, pour toutes les formes galéniques, sont apparues des directives de "Good Manufacturing Practice" ; c'est ainsi que AZRIA (15) signale que certaines directives, comme la recherche de particules métalliques dans les pommades ophtalmiques, commencent à voir le jour, sans cependant qu'elles se matérialisent par des chiffres limites.

5.2.2.3. Récipients et accessoires d'administration :

Malgré des essais physico-chimiques nombreux et divers, dans les pharmacopées il n'y a actuellement, tant en France qu'à l'Etranger, ni réglementation, ni directive dans le domaine de la numération de la contamination particulaire due aux récipients ou au matériel d'administration, ni réglementation sur leur lavage éventuel.

WILLIAMS et BARNETT (286) ont suggéré que des standards soient appliqués à l'équipement d'administration des formes injectables.

5.2.2.4. Les principales tentatives et propositions de normes pour les formes injectables :

Les premières publications proposant des normes limites de contamination des formes injectables remontent au milieu des années 60. Ces tentatives eurent lieu dans trois pays : l'Australie, puis l'Angleterre et les Etats-Unis. Dans chaque cas, les pouvoirs publics tentèrent de reprendre ces propositions pour les officialiser, avec plus ou moins de succès.

[illegible], à la suite des travaux de GARVAN et GUNNER, VESSEY et KENDALL (274) avancent, en 1966, les limites suivantes :

1.000 [illegible]	[illegible]	[illegible]	par millilitre de solution
250	"	> 3,5 µm	
100	"	> 5 µm	
25	"	> 10 µm	

A la suite de ces travaux et suggestions, le Ministère de la Santé australien publia un projet de normes limitant les particules dans les solutés injectables de grand volume :

- par ml de solution, la moyenne des comptages effectués à l'aide d'un compteur électronique, sur 10 récipients, ne doit pas dépasser 250 particules d'un diamètre supérieur à 3,5 µm. De plus, la somme de cette moyenne et du double de l'écart-type doit être inférieure à 500 par millilitre ;
- en outre, aucun flacon ne doit contenir de particules visibles à l'oeil nu.

En 1967, ce projet de normes fut modifié pour accepter des variations statistiques à l'intérieur de comptages de flacons d'un même lot.

BEST, cité par HOPKINS (123), signale qu'en août 1970 le projet de normes attendait toujours l'approbation du parlement !

Les normes australiennes semblent actuellement beaucoup trop larges et, au lieu de 250.000 particules ou de 125.000 particules par litre, beaucoup de solutés sont actuellement pollués par 250-500 contaminants.

Toutefois, l'introduction de normes en Australie a le principal mérite d'avoir permis une très nette amélioration de la qualité des solutions intra-veineuses.

• En ANGLETERRE, GROVES (97) estime que les tailles inférieures à 5 µm sont négligeables puisqu'elles atteignent l'ordre de grandeur des dimensions érythrocytaires. Il propose comme limite un maximum de 50 particules supérieures à 5 µm par millilitre.

Cette limite dimensionnelle peut paraître raisonnable car, au regard du développement technologique, le réalisme nous impose de considérer que si les particules supérieures à 5 µm étaient éliminées ou limitées, l'amélioration serait énorme.

o Aux ETATS-UNIS, à la suite du symposium organisé en 1966 par la Food and Drug Administration (205), un programme avait été proposé en vue de réduire, sinon d'éviter la pollution des solutés injectables par des corps étrangers, mais aucune norme officielle n'a découlé dans l'immédiat. En juillet 1979, selon HOFFMANS (123), "l'United States Pharmacopeial Convention" amorce que les efforts pour maintenir des limites objectives sur les types de matières particulaires autres que le métal se sont révélés inefficaces du fait qu'aucune procédure appropriée n'est actuellement disponible, qui détecte et mesure de façon fiable les particules non métalliques.

Depuis, suite à des travaux de recherche, dont la plupart portèrent sur des méthodes d'étude et de comptage en microscopie, les normes de l'USP XIX ont été adoptées.

5.2.2.5. Normes particulières au cas de l'amiante :

Dans le cas particulier de l'amiante, comme à son habitude, c'est la Food and Drug Administration qui, la première, a étudié le problème en vue, dans un premier temps, de :

- déterminer les utilisations des fibres d'amiante dans les procédés de fabrication de l'Industrie Pharmaceutique ;
- contrôler par microscopie électronique et optique la présence éventuelle d'amiante dans les médicaments ;

dans un second temps, de faire les recommandations pour les mesures à prendre.

Ces travaux ont abouti à l'interdiction des filtres d'amiante dans les procédés de fabrication.

En France, si ce n'est depuis la fin 1976, les autorités semblent s'être très peu préoccupées du problème de l'amiante en général et dans les médicaments en particulier. Ce n'est que sous la pression de l'opinion publique alarmée par la presse et les consommateurs que quelques recommandations ont été faites et des travaux de contrôle, peu coordonnés à notre avis, ont été

entrepris. Une lettre de recommandation du Service Central de la Pharmacie et des Médicaments, datée d'octobre 1976, invite l'ensemble des laboratoires pharmaceutiques à prendre toutes mesures nécessaires pour remplacer les filtres d'amiante.

En ce qui concerne la présence d'amiante dans le talc, la limite suggérée par la Food and Drug Administration en 1973 serait de 1 %, c'est-à-dire le niveau détectable le plus faible par les techniques courantes (41, 283).

Dans le cas des préparations injectables, il n'est pas question de proposer un chiffre limite en amiante dans la mesure où, technologiquement, il paraît possible de l'éliminer totalement. Cependant, là encore, il semble absolument nécessaire de standardiser les méthodes d'étude.

5.3. CONCLUSION -

Devant l'insuffisance des pharmacopées, de nombreux chercheurs prirent l'initiative de proposer des méthodes d'étude nouvelles, accompagnées de normes limites de contamination. Ils ont, par cette attitude, entraîné une prise de conscience des autorités qui ont d'abord publié des recommandations, puis ont inclus ces textes dans deux pharmacopées. Il reste, à l'heure actuelle, encore beaucoup à faire, et en particulier à lutter contre le manque d'homogénéité des propositions de normes.

De plus, une concurrence industrielle entre les fabricants des principaux appareils de mesure et de comptage des particules constitue un handicap pour l'uniformisation future de ces normes, dont le but essentiel est qu'elles soient applicables par tous.

6. LES MOYENS DE LUTTE CONTRE LA CONTAMINATION PARTICULAIRE

6.1. INTRODUCTION -

L'Industrie Pharmaceutique, soucieuse d'appliquer au mieux les pratiques de bonne fabrication, apparaît de plus en plus concernée par les problèmes de contamination particulaire, aussi bien de l'air et des surfaces de ses ateliers que de ses fabrications.

L'expérience faite dans des secteurs comme l'électronique, l'informatique ou l'aérospatiale, montre que l'obtention du produit pur, ou du moins de qualité contrôlée, suppose qu'à tout moment les composants qui entrent dans sa confection et les conditions de cette confection fassent l'objet d'une surveillance attentive.

Nous avons vu déjà en détail, au paragraphe 3, les origines possibles de cette contamination particulaire, suggérant, par là même, quels pouvaient être les moyens de lutte contre les particules. Nous n'insisterons donc ici que sur quelques points qui méritent une attention particulière et qui concernent les préparations injectables.

6.2. LUTTE AU NIVEAU DE LA FABRICATION -

(207, 319, 269, 136)

Il faut d'abord assurer dans les locaux de travail un environnement propre. De nombreux auteurs ont insisté sur la nécessité d'un personnel entraîné et l'intérêt des enceintes à flux d'air laminaire (LOUCHHEAD, LEACH, HOWARTH, SHERMAN) - (157, 148, 124, 236).

Le lavage des accessoires de conditionnement (récipients, bouchons) a été étudié par de nombreux auteurs (Le GIRN, [illegible], HOPKINS, [illegible]) - (87, 68, 71, 122, 116, 70, 105). C'est un problème technique très délicat. Un travail de BENOIST et coll. (18) propose une méthode de contrôle des ampoules vides. Le GIRN insiste également sur les conditions de stockage des récipients vides.

SOVOL et SHERMAN (242, 236) signalent l'intérêt et les modalités de dispositifs de filtration finale sur membrane.

6.3. LUTTE AU NIVEAU DE L'UTILISATION - (208, 209, 250)

• La libération de particules de verre à l'ouverture des ampoules est une cause essentielle de pollution.

Divers auteurs se sont attachés à ce problème (244, 18, 48, 54, 62, 81, 93, 72, 127, 263), mais ce sont surtout ERNEROT et DAHLINDER (72) qui ont étudié les différentes méthodes d'ouverture des ampoules.

- Le procédé le plus polluant est celui qui consiste à casser la pointe de l'ampoule après avoir donné un coup de lime.
- Les ampoules auto-cassables donneraient, à l'ouverture, des particules plus grosses et un peu moins nombreuses que celles provenant du mode d'ouverture cité précédemment.
- On peut, lors de l'ouverture à la lime, pour éliminer les particules provenant du sillon, essuyer la pointe avec un tampon d'alcool à 70º avant de la briser.
- Une autre amélioration consiste à pratiquer cette méthode après avoir immergé l'ampoule dans un bain-marie à 70ºC afin d'en augmenter [illegible]
- On peut utiliser un chalumeau à acétylène, dont la flamme permet par fusion de la pointe une ouverture sans écla

Les essais suivants sont cités : pour une ampoule de 2 ml ouverte à la lime verticalement, on a dénombré 1.200 particules supérieures à 3,5 µm. Si, avant d'être cassée, la pointe de cette ampoule est essuyée à l'aide d'un tampon d'alcool, le nombre de particules de plus de 3,5 µm tombe à 136. Si la même ampoule est ouverte à la flamme, le nombre de ces particules est abaissé à 66 (13).

Des ampoules d'eau distillée de 1 ml, ouvertes à l'aide d'une lime, montraient 360 particules en moyenne, tandis que des ampoules auto-cassables n'en contenaient que 140. Pour les mêmes ampoules ouvertes à l'aide d'un micro-chalumeau, les résultats de numération étaient de 60 (216).

Après avoir rappelé les problèmes posés par l'ouverture des récipients en verre et par l'utilisation des accessoires de perfusion, il apparaît souhaitable, comme l'ont proposé de nombreux auteurs, de conseiller la filtration sur membrane pendant l'administration des préparations injectables.

L'utilisation, en fin de circuit, d'un filtre membranaire placé en avant de l'aiguille intra-veineuse permettrait de décontaminer avec efficacité la solution, tant du point de vue microbiologique que du point de vue particulaire.

De nombreux auteurs ont fait des propositions dans ce domaine (258, 257, 160, 125, 163, 164, 61, 128) :

- RYAN et coll. (223) ;
- GROVES (98, 93) ;
- REYNIER et BOVIS (215) ;
- SANDELL et ERNEROT (226) ;
- TURCO et DAVIS (264, 266, 267).

Pour être efficace, ce système doit cependant permettre un débit horaire suffisant. ROLAND (216) signale avec raison que le système semble difficilement généralisable à toutes les perfusions pour des raisons économiques évidentes. Les prix des solutés seront anormalement élevés, et il ne paraît pas souhaitable d'augmenter encore les charges de la Sécurité Sociale.

Par ailleurs, l'utilisation systématique de ce filtre serait reconnaître implicitement un défaut de qualité. Et faut-il résoudre les problèmes de la pollution atmosphérique crée par certaines industries en suggérant à la population de porter un masque à gaz ?

6.4. Conclusion :

Ainsi, le pharmacien va-t-il de plus en plus souvent se préoccuper du problème particulaire de l'air et des gaz, des liquides, des surfaces et des produits qu'il fabrique. Il convient de souligner que chaque ingrédient, chaque étape de fabrication, chaque élément de l'équipement, chaque geste d'un membre du personnel, peut contribuer à la contamination particulaire. L'élimination globale est un travail qui doit être poursuivi par les responsables de la fabrication avec une énergie continue.

La technologie pharmaceutique en matière de décontamination particulaire est loin d'atteindre les performances de la stérilisation. Les niveaux les plus propres que la technique actuelle permet de réaliser couramment sont encore mesurables (quoique avec quelques précautions). Ainsi :

- pour l'air, on atteint sans problème moins de 1.000 particules supérieures à 0,5 µm par m^3 ;
- pour les liquides, on réalise moins de 10 particules supérieures à 3 µm par cm^3 ;
- pour les surfaces, probablement moins de 5 particules supérieures à 3 µm par dm^2 (102).

Pour pouvoir lutter efficacement contre la contamination particulaire, il faut être doté de moyens d'étude permettant la mesure et le contrôle de cette contamination ; la panoplie dont dispose le pharmacien à cet usage est vaste, elle va des techniques les plus simples aux plus modernes, ainsi que nous allons le voir dans le chapitre suivant.

Deuxième Partie

LES METHODES D'ETUDE

DE LA CONTAMINATION PARTICULAIRE

D E S M E D I C A M E N T S

1. GENERALITES

Nous nous proposons, en guise de préambule à la description des principales méthodes d'étude des particules, d'aborder trois points importants pour la suite de l'exposé :

- quelques notions de base concernant l'analyse granulométrique ;
- les problèmes posés par l'échantillonnage ;
- les modes d'expression numérique du degré de contamination.

1.1. NOTIONS D'ANALYSE GRANULOMETRIQUE -

Selon la définition officielle (AFNOR) - (256) - la granulométrie est une science qui a pour objet la mesure des dimensions et la détermination de la forme des grains ou particules.

Avant donc d'envisager les différentes méthodes de mesure, il n'est pas inutile de rappeler quelques notions indispensables à la bonne compréhension des appareils de mesure et des résultats à interpréter.

• RAPPEL DES DEFINITIONS (238, 256, 34, 214, 233, 47) :

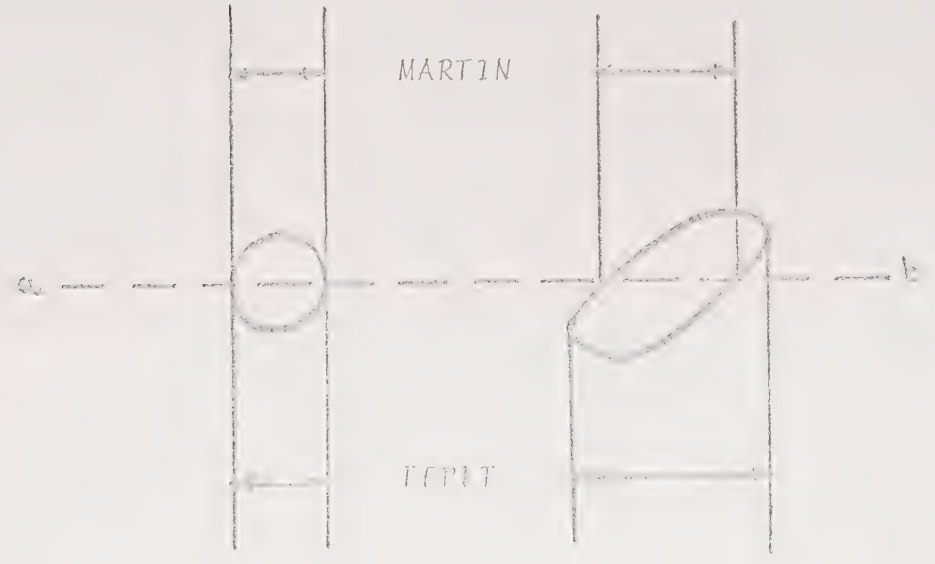
- Le diamètre de la surface (Ds) est le diamètre de la sphère qui a la même surface que la particule. Cette mesure n'est possible que si la particule possède une forme cristalline, géométrique et définie.
- Le diamètre du volume (Dv) est le diamètre de la sphère qui aurait le même volume que la particule.

- Le diamètre projeté (Dp) est le diamètre de la surface projetée d'une sphère qui aurait la même valeur que la surface projetée d'une particule placée dans sa position la plus stable.

Si l'on se fixe arbitrairement une direction (a - b) qui traverse le profil des particules, sans s'occuper de leur orientation, on peut estimer directement le diamètre des particules ; c'est le diamètre Martin. Celui-ci est un diamètre statistique puisque la taille et la forme des particules ne sont pas orientées.

Si la mesure est faite entre deux tangentes parallèles, on obtient le diamètre Feret.

Si le profil de la particule est symétrique, les deux diamètres sont égaux (figure 3).



- Figure 3 -

Dans [illegible] les mesures sont [illegible]

1.2. PROBLEMES POSES PAR L'ECHANTILLONNAGE -
(243, 285)

Si le prélèvement n'est pas effectué avec une attention particulière et un soin tout à fait spécial, il sera impossible d'obtenir des résultats valables et reproductibles, même avec des méthodes de mesure particulièrement soignées. On peut rappeler les règles suivantes :

- Eviter les pollutions étrangères : l'équipement destiné à l'échantillonnage, les récipients, les appareils d'analyses et les filtres doivent être d'une propreté extrême.
- Le volume d'un prélèvement doit être approprié au volume total de l'échantillon.
- Ce prélèvement doit être représentatif.

1.3. EXPRESSION NUMERIQUE
DU DEGRE DE CONTAMINATION -
(102, 238, 241)

Une première façon d'exprimer le degré de contamination est de donner la concentration pondérale ou volumétrique des particules polluantes. On va généralement plus loin pour trois raisons principales :

- dans la pratique industrielle courante, les contaminants sont maintenus à une très faible concentration pondérale qui, outre qu'elle est délicate à mesurer, donne des valeurs qui n'ont plus de signification très concrète ;
- la simple mention de la concentration pondérale apporte peu de renseignements sur la nature de la contamination, renseignements qui sont fort utiles dans la recherche des sources de pollution et des moyens de les combattre. Ainsi, à concentration pondérale égale, purifier un liquide souillé de particules de 1 µm ou de 50 µm ne relève pas des mêmes appareillages ;

- la notion même de contaminant sous-entend la plupart du temps un rayon dimensionnel. Ainsi, dans l'électronique, on considère qu'une particule inférieure à 0,5 µm, en suspension dans l'air, n'a généralement aucune conséquence sur la qualité du produit fini, et ainsi, quand on parle de contamination particulaire, il est sous-entendu qu'il s'agit de tailles supérieures à 0,5 µm.

La façon la plus courante de caractériser une contamination particulaire est finalement d'indiquer sa concentration numérique en considérant toutes les particules supérieures à une certaine taille. Les unités que la pratique a fini par imposer sont les suivantes, en nombre de particules :

- par m^3 pour les gaz ;
- par cm^3 pour les liquides ;
- par dm^2 pour les surfaces.

Lorsque l'on veut aller plus loin dans la description de l'état de décontamination, on cherche à obtenir la distribution granulométrique des particules, c'est-à-dire la fréquence avec laquelle se présente, dans une population donnée, une taille particulaire définie.

Dans un certain nombre de cas, on évalue à part la partie de la population composée de fibres ou de particules filiformes. Enfin, il arrive aussi que l'on s'intéresse à telle ou telle espèce chimique définie, comme l'amiante ; mais cette pratique reste rare pour le moment, entre autres raisons, parce qu'elle est coûteuse.

En ce qui concerne l'amiante, le mode d'expression du niveau de contamination n'est pas encore standardisé, ce qui rend parfois difficile la comparaison des différents résultats publiés, certains étant exprimés en concentration pondérale, d'autres en nombre de fibres par unité de volume (15).

2. LES METHODES D'ETUDE DES PARTICULES DANS LES SOLUTES INJECTABLES

Elles sont nombreuses et font appel à des techniques variées. On distingue habituellement deux grands groupes de méthodes d'étude de la pollution particulaire des solutés injectables :

- les méthodes non destructrices du contenant ;
- les méthodes destructrices du contenant.

Les premières permettent, si on le désire, de réaliser un contrôle à 100 %, c'est-à-dire portant sur la totalité des unités fabriquées (241).

Les secondes, par contre, imposent un échantillonnage représentatif du lot de fabrication.

2.1. LES METHODES NON DESTRUCTRICES DU CONTENANT -

La mise en oeuvre des méthodes de contrôle non destructrices peut faire appel à trois degrés de complexité. Nous distinguerons :

- le contrôle optique humain avec déplacement manuel de l'échantillon ;
- le contrôle optique semi-automatique par machines de transfert, dans lequel le déplacement des récipients à contrôler est entièrement mécanisé ;
- le contrôle par machines entièrement automatique.

2.1.1. CONTROLE OPTIQUE MANUEL
AVEC DEPLACEMENT MANUEL DE L'ECHANTILLON.

L'ensemble de ces méthodes est connu sous le nom de contrôle par mirage et présente de nombreuses variantes (7, 241, 117, 21, 224, 138). Le produit est le plus souvent observé éclairé par une forte lampe sur fond contrasté noir et blanc. L'efficacité de ce type de contrôle est liée au coup d'oeil de l'opérateur et à la fatigue visuelle occasionnée par l'observation.

CARVAS et GUNNER (82), puis VESSEY et KENDALL (273), ont décrit une technique particulière d'examen visuel par diffusion de lumière, faisant appel à l'effet TYNDALL : un fin rayon lumineux, d'intensité et de taille définies, est projeté au centre de l'échantillon à examiner. La lumière est réfléchie par les particules et provoque, si l'on regarde l'échantillon sous un angle donné, un scintillement dont l'intensité est fonction de la taille de la particule. Il semble ainsi possible, avec une certaine habitude, de se faire un jugement sur la taille des particules.

2.1.2. CONTROLES OPTIQUES COMPORTANT
UN TRANSFERT AUTOMATIQUE DE L'ECHANTILLON.

Les opérations de transfert allongent le temps de contrôle ; c'est pourquoi, un certain nombre d'appareils ont été étudiés pour éviter cette manipulation.

A partir d'un magasin d'approvisionnement dans lequel les ampoules sont rangées, chacune d'entre elles est amenée par un système de transfert vers le poste d'observation. Elle passe au préalable sur un rouleau qui l'entraîne en rotation ainsi que son contenu. A la station de contrôle, l'ampoule est arrêtée et son contenu, toujours en rotation, est observé.

Trois machines fonctionnant selon ce principe sont commercialisées :

- Machine BREVETTI, type C.E.A. (288, 241).
- Machine ROTA, type Madaus (88, 272).
- Machine STRUNK, type KVLA 06 (165, 281).

La machine NF14, type SP 4, adopte un principe légèrement différent : les ampoules ne sont pas mirées après mise en rotation, mais le seul œil de l'opérateur.

La critique que l'on peut faire à tous ces appareils est l'éclairage d'un travail à cadence élevée, alors que l'attention soutenue ne peut être longtemps envisagée. Le contrôle devient alors très subjectif, surtout si on lui impose un rythme mécanique excessif.

2.1.3. CONTRÔLE PAR PROCÉDÉS ENTIÈREMENT AUTOMATIQUES.

Ces machines permettent un transfert des récipients et un examen de leur contenu entièrement automatisé, dans lequel l'appréciation de l'oeil humain est remplacée par un système électronique. Deux appareils sont décrits à ce jour :

- MACHINE A MIRER ELECTRONIQUE "HITACHI", type AP 037 (241) :

Les ampoules rangées et amenées sur le plateau de distribution passent en rotation à deux postes de contrôle pour être stoppées brusquement. Après l'arrêt de l'ampoule, le liquide reste en rotation et l'ampoule est éclairée par un faisceau de rayons lumineux concentrés.

Les corps étrangers se trouvant dans le liquide réfléchissent des impulsions lumineuses qui sont transformées en un signal électrique. Si ce signal est supérieur à un seuil déterminé au préalable, l'ampoule est rejetée.

- MACHINE A MIRER ELECTRONIQUE "AUTOSKAN", Société EMHARDT CORPORATION, U.S.A. (156 210, 58, 107).

Lorsque l'ampoule est arrêtée et son contenu en mouvement, une caméra T.V. associée à un ensemble électronique prend diverses images successives du récipient. Ces images, mises en mémoi

ensuite comparées. Si les particules repérées sur chaque image sont dans la même position, il s'agit alors de particules stationnaires, telles qui possèdent, tacher ou impuretés sur l'extérieur du contenant ; dans le cas contraire, les particules sont dans le soluté, ce qui provoque, au-delà d'un certain seuil, le rejet de l'ampoule.

Les particules sont décelées jusqu'à 40 µm environ.

2.2. [illegible] PAR LES METHODES DESTRUCTRICES DU CONTENANT -

2.2.1. GENERALITES.

Comme son nom l'indique, le contrôle destructif ne peut être réalisé qu'après ouverture de l'unité de dispensation et, contrairement au "contrôle visuel 100 %", il ne peut s'effectuer que sur un échantillonnage statistique restreint, représentatif du lot à tester.

L'intérêt des méthodes destructrices va plus loin que le simple but de rejeter, dans une production, un lot qui ne correspondrait pas aux normes préétablies de pollution particulaire : ces techniques permettent d'apprécier des critères inaccessibles aux contrôles visuels et renseignent le fabricant sur :

- le nombre,
- la taille,
- la forme,
- la nature des particules,

et, par là même, sur les sources possibles de contamination.

Un certain nombre d'appareillages sont utilisables pour réaliser ces contrôles.

Quel que soit le principe de ces méthodes nécessitant la destruction du conditionnement, il est impératif de respecter un certain nombre de règles élémentaires, sans lesquelles il sera impossible d'obtenir des résultats reproductibles et significatifs d'un lot de fabrication. Elles concernent en particulier :

- la représentativité de l'échantillonnage, permettant une éventuelle interprétation statistique des résultats et une appréciation aussi précise que possible de l'état de contamination du lot entier ;
- l'absence de pollutions étrangères au cours des manipulations d'analyse, entraînant un comptage erroné en excès des particules présentes dans le soluté ;
- inversement, tout phénomène d'adsorption électrostatique sur différentes parois ou de sédimentation des particules, provoquant un comptage - cette fois, déficitaire - de la pollution particulaire des liquides à analyser.

Nous verrons successivement :

- les méthodes permettant un COMPTAGE AUTOMATIQUE des particules ;
- les méthodes d'OBSERVATION et de COMPTAGE des particules ;
- les méthodes d'ANALYSE de la constitution chimique des particules.

2.2.2. METHODES DE COMPTAGE AUTOMATIQUE DES PARTICULES.

(5, 70, 161)

2.2.2.1. Généralités et principes :

Ces méthodes sont basées :

- soit sur des mesures de variations conductimétriques induites par les particules ; ces appareils sont connus sous le nom de COMPTEURS COULTER ;

- soit sur la mesure des effets des particules sur un rayonnement ; on trouve dans ce groupe :
  - des appareils utilisant un rayon laser,
  - des appareils utilisant la diffusion de la lumière,
  - des appareils utilisant l'absorption de la lumière.

Nous allons donner quelques précisions sur chacun de ces appareils.

2.2.2.2. Méthodes basées sur la mesure des effets des particules sur un rayonnement :

2.2.2.2.1. La néphélométrie :

Parmi les appareils basés sur l'utilisation d'un rayonnement lumineux, les néphélomètres sont sans doute les moins performants puisqu'ils ne fournissent qu'une expression numérique de la quantité de matières en suspension dans un liquide injectable, sans en donner la répartition granulométrique.

En 1961, HUDSON (126) décrit une de ces techniques ; depuis, elles ne semblent pas avoir été reprises.

Un faisceau lumineux est projeté sur l'échantillon à analyser. La lumière diffusée est recueillie à environ 90º du rayon incident par une cellule à couches d'arrêt et évaluée en fonction de l'intensité de la lumière incidente. Il y aurait proportionnalité entre la concentration des particules et le flux lumineux diffusé.

2.2.2.2.2. Les appareils utilisant un rayon laser : (62, 94)

Les applications des rayons laser dans le domaine de la granulométrie sont, à l'heure actuelle, en début d'expansion. C'est pourquoi, leur application à la mesure de la contamination particulaire des solutés injectables n'a pas été jusqu'ici très utilisée.

Un article de GROVES et YALABIK (101), paru en 1974, signale une technique (photosédimentomètre centrifuge) permettant grâce au rayon laser de mesurer des particules de taille inférieure à 1 µm.

Nous pensons que les techniques utilisant le laser pourraient, dans l'avenir, se développer.

2.2.2.2.3. Les appareils utilisant la diffusion de la lumière (light scattering) :
(177, 239)

La technique de mesure et de comptage des particules par diffusion de la lumière a été très développée dans le cadre des travaux sur le contrôle de l'environnement des atmosphères ; parmi les nombreux appareils mis au point selon ce principe, nous en retiendrons particulièrement un : le COMPTEUR ROYCO.

• PRINCIPE DES COMPTEURS A DIFFUSION DE LUMIERE (33, 143, 123) :

Un dispositif envoie un rayon de lumière sur les particules en suspension dans l'air ou la solution à analyser, et la détection des particules est réalisée par enregistrement des impulsions lumineuses dispersées par ces particules grâce à un photomultiplicateur.

Le signal lumineux ainsi transformé en signal électrique est conduit vers une électronique qui assure l'enregistrement et le captage de ces signaux.

La mesure des dimensions dépend de la sélection d'un circuit amplificateur.

Les gammes d'utilisation et les capacités de cet appareil peuvent être présélectionnées lors de sa fabrication et, ainsi, adaptées aux besoins de l'utilisation.

Certains modèles mesurent la dispersion de la lumière proche de 180º, d'autres de 90º.

Pour la mesure des particules dans les gaz, la sensibilité de l'appareil descend jusqu'à 0,5 µm.

Ces appareils peuvent fonctionner en continu.

En ce qui concerne la mesure des particules dans les liquides, le COMPTEUR ROYCO modèle 345, actuellement au catalogue du fabricant, n'utilise pas la mesure de la diffusion de la lumière mais, au contraire, la mesure de la lumière absorbée, ce qui semble mieux convenir au cas des particules dans les liquides. Nous étudierons donc ce modèle particulier des COMPTEURS ROYCO dans le paragraphe suivant.

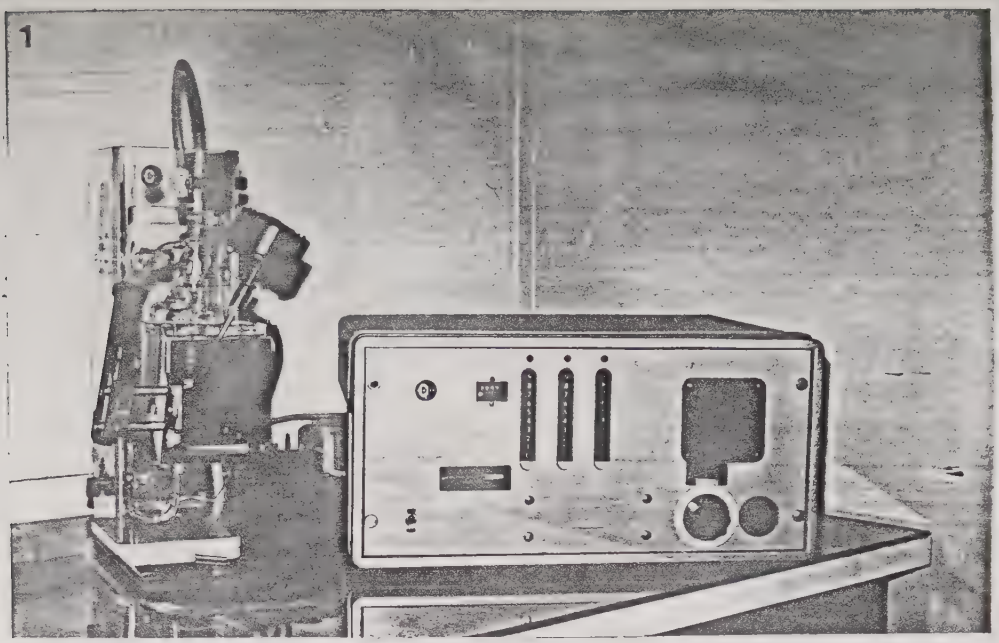
PLANCHE n° 1

Photographie n° 1 : compteur COULTER

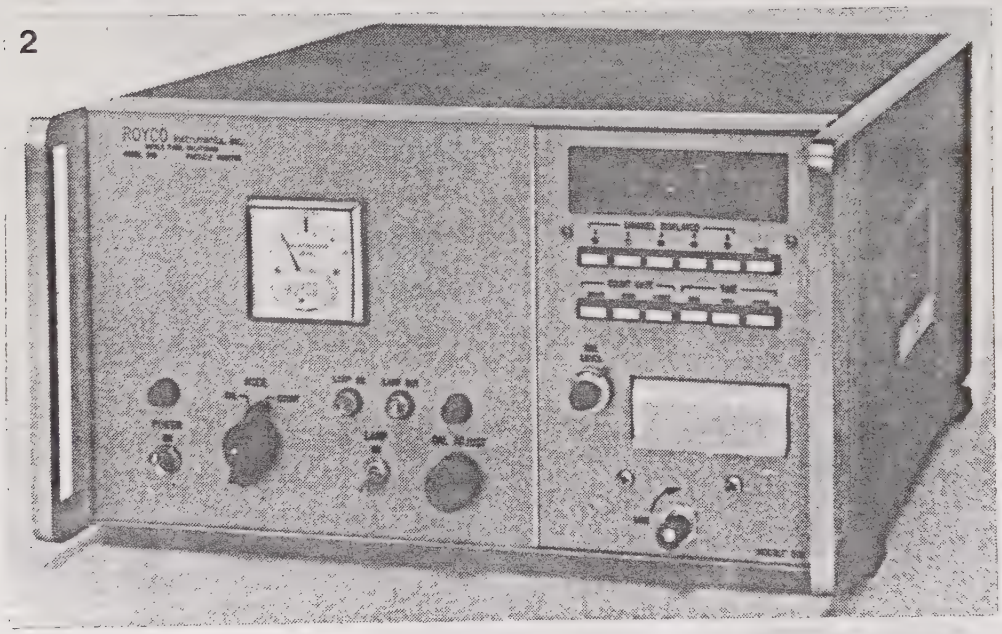
Photographie n° 2 : compteur ROYCO

Photographie n° 3 : Analyseur d'images TT MC Millipore

1



2



3

2.2.2.2.4. Les appareils utilisant l'absorption de la lumière :

o Un appareil ROYCO, tout à fait analogue à celui qui existe pour l'air, a été développé pour les liquides ; mais il utilise la mesure de la lumière absorbée.

Sa sensibilité en taille est moindre puisqu'il ne descend qu'à 2 µm environ. Il peut être très automatisé et servir d'appareil de mesure en continu d'un débit de liquide pour donner l'alarme lorsqu'un seuil prédéterminé de pollution est dépassé. Il a été peu utilisé jusqu'ici en France, mais il nous semble qu'à condition de ne pas chercher ce qui est inférieur à 2 µm, il doit pouvoir rendre des services intéressants en contrôle de production.

Les avantages du dispositif ROYCO, selon DIGRADO (59, 60), sont :

- facilité relative d'emploi ;
- pas de personnel très qualifié ;
- facile à nettoyer pour obtenir un bruit de fond faible.

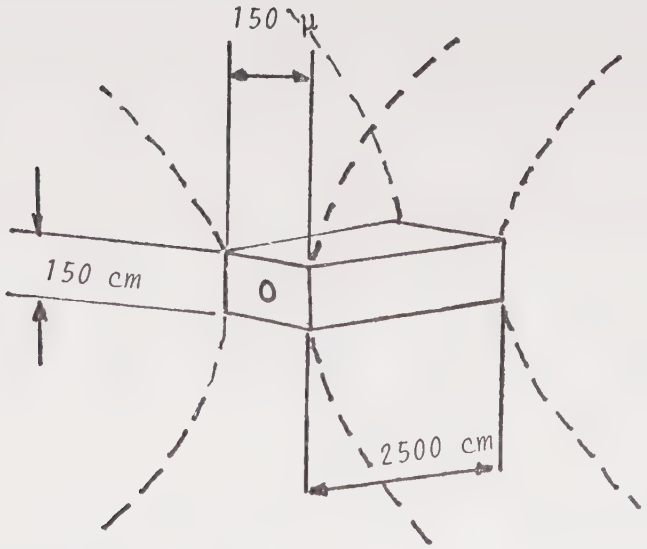
o Un autre type d'appareil électronique de comptage, cité dans la littérature (167, 280), est basé sur le principe du masquage de la lumière. On l'appelle le compteur de particules H.I.A.C.(*), et il est fabriqué par High Accuracy Products Corporation (actuellement H.I.A.C. Instruments Division, Pacific Scientific Company - NDT).

- PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT :

Les compteurs H.I.A.C. fonctionnent selon le principe de l'absorption de lumière. Une photodiode, éclairée par une lumière traversant des hublots, garde un courant de sortie constant. Lorsqu'une particule passe, elle occulte une quantité de lumière proportionnelle à sa taille. Si la concentration maximale n'est pas dépassée (4.000 particules par seconde), il n'y a qu'une particule tous les dix volumes de mesure et chaque particule est mesurée individuellement.

(*) H.I.A.C. représenté par Mesure et Automatisme pour l'Industrie et la Recherche (M.A.I.R.) - 1 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 92 BOULOGNE, France.

Le fluide à étudier s'écoule au travers d'un petit tube rectangulaire, en face d'un hublot. Un rayon lumineux collimaté provenant d'une lampe au tungstène est dirigé, à travers le liquide, sur un photodétecteur. Chaque fois qu'une particule traverse le rayon lumineux, elle interrompt une portion de la lumière, produisant une réduction correspondante dans la quantité de lumière atteignant la photodiode. L'amplitude de l'impulsion de courant qui en résulte est proportionnelle à la dimension de la particule. Cette dimension est enregistrée comme le diamètre du cercle ayant la même surface que la section droite de la particule. Du fait de cette méthode de mesure, l'appareil fonctionne avec tous les fluides, qu'ils soient électrolytiques ou non, et les compteurs ont déjà fait la preuve de leur bon fonctionnement dans les installations à distance, en chaîne.



- Figure 4 -

- GRANDEURS MESURÉES :

  L'H.I.A.C. mesure la section maximale de la particule exposée pendant son passage dans la zone de mesure. Les tables d'étalonnage H.I.A.C. fournissent le diamètre des sphères de même section droite que les particules mesurées.

  Les appareils H.I.A.C. classent en taille et en nombre les particules suspendues dans un fluide contenu dans des flacons d'échantillonnage ou s'écoulant dans un circuit. Ces particules sont classées simultanément en un à six canaux, avec une extension possible à deux canaux. Ces canaux sont présélectionnés par l'opérateur. Les particules sont mesurées avec précision quelles que soient leur forme, leur dimension ou leur couleur. Ces appareils comptent très rapidement (environ 4.000 particules par seconde).

Cet appareil est déjà largement utilisé dans l'Industrie Pharmaceutique, dans divers pays du monde : Etats-Unis, Canada, Japon, Suède, Angleterre.

2.2.2.3. <u>Appareils utilisant une mesure de variation conductimétrique</u> :

Le plus connu de ces appareils est le COMPTEUR COULTER. Cependant, d'autres compteurs utilisant le même principe ont été signalés :

- Ljunberg, Sansar (273) ;
- Celloscope, décrit et utilisé par SANDELL et [illegible] ([illegible]) et [illegible] ([illegible]) ;
- le "Multichannel Particle Size Analyser", décrit par CURBY (51), dans lequel les modules électroniques d'analyse et de comptage sont très développés.

Nous ne donnerons de détails que sur les COULTER COUNTER de la firme Coultronic (2, 21, 100, 155, [illegible]).

C'est certainement le plus connu des compteurs en milieu liquide. Depuis 1958, l'emploi des COULTER COUNTER s'est généralisé dans de nombreux domaines, tant industriels que biologiques. Il a d'abord été développé pour les numérations globulaires, puis pour les problèmes d'analyse granulométrique.

Ces appareils sont des instruments de choix pour l'étude granulométrique des particules en suspension dans des liquides, et en particulier dans les solutés ioniques ; leur essor résulte principalement de leurs possibilités d'automatisation des techniques et de la rapidité des analyses.

- PRINCIPE DE L'APPAREIL (32, 103, 137, 114) :

Le principe de ces appareils, bien connu des physiciens par ailleurs et mentionné déjà dans de nombreuses publications, sera brièvement rappelé ici.

Le fonctionnement des COULTER COUNTER est basé sur les variations de résistivité créées par le passage des particules à analyser dans une micro-ouverture calibrée au sein d'un liquide conducteur et située entre deux électrodes, entre lesquelles est établie une tension continue. A une concentration convenable, les particules traversent le micro-orifice, une à une, en déplaçant à l'intérieur de celui-ci un volume identique de liquide conducteur, et font varier ainsi la résistivité du système entre les deux électrodes.

- Figure 5 -

Si l'on applique une différence de potentiel entre les deux électrodes, chaque passage d'une particule dans la micro-ouverture produira :

- le remplacement de son propre volume d'électrolyte ;
- une augmentation (ou une diminution) de la résistivité, entraînant une brève diminution (ou augmentation) d'amplitude dont l'amplitude sera proportionnelle au volume des particules. Les impulsions de courant sont transformées en impulsions de tension, amplifiées, discriminées en amplitude, puis comptées automatiquement.

L'amplitude des impulsions étant proportionnelle au volume des particules pour une ouverture donnée, après étalonnage, le compteur mesure directement ces volumes. Une analyse granulométrique qualitative permet de déterminer la répartition des particules assimilées à des sphères.

- LE COULTER MESURE LE DIAMETRE DU VOLUME (Dv) :

Chaque comptage automatique s'effectue sur un volume rigoureux et constant de la solution, au moyen d'un manomètre à mercure muni de contacts qui déclenchent et arrêtent le comptage.

Un traitement électronique approprié permet de compter toutes les particules supérieures à un seuil dimensionnel que l'on affiche sur l'appareil. On peut commencer les mesures à partir de 1 µm avec l'orifice le plus fin (50 µm) et aller jusqu'à 250 µm (orifice : 500 µm). Sur un circuit à seuil réglable manuellement, seules seront comptées les impulsions dont l'amplitude atteint ou dépasse ce seuil. Celles-ci sont visualisées sur un oscilloscope qui facilite le choix du niveau de seuil pour une taille de particule donnée.

Enfin, un étalonnage de l'appareil à l'aide d'une suspension de particules de taille connue est indispensable pour rattacher les niveaux d'impulsion obtenus à des tailles de particules.

Bien qu'il soit largement employé, un grand nombre de chercheurs ont exprimé leur souci au sujet des limites de cet appareil (55, 20, 60, 69).

En effet, certaines restrictions sont à faire quant à l'utilisation des COULTER COULTER pour le contrôle des particules dans les solutés injectables. Comme nous venons de le dire, les particules sont assimilées à des sphères, et les fibres de cellulose ou d'amiante peuvent sinon boucher la micro-ouverture, du moins fausser le comptage.

L'hétérogénéité sur le plan conductimétrique des particules présentes dans le soluté injectable pourrait également entraîner une erreur dans la répartition. L'emploi d'un agitateur s'avère nécessaire au moment de l'analyse lorsque les particules présentes dans le soluté sont denses ou de grande taille ; il convient alors d'éviter la formation de bulles d'air et de tenir compte des parasites occasionnés par cet agitateur et pouvant entraîner un comptage par excès.

Enfin, ce système de comptage nécessite l'emploi de solutions conductrices, et certaines solutions injectables telles que les solutés de glucose ou de sorbitol, par exemple, ne le sont pas. Toutefois, la difficulté peut être aisément tournée en diluant le produit dans une solution conductrice exempte de particules.

Il est également extrêmement douteux que les compteurs puissent fonctionner de façon satisfaisante dans des montages à distance, en ligne.

Il est à signaler également que, comme tous les compteurs automatiques, ce système d'analyse ne permet pas une visualisation nette des particules et, si leur répartition et leur nombre sont déterminés avec précision, leur nature, donc leur origine, ne peut être identifiée.

Ainsi, malgré les quelques inconvénients cités précédemment et pour la plupart surmontables, ce type de mesure est relativement bien adapté au contrôle destructif de la contamination particulaire des solutés injectables.

2.2.2.4. Cas particulier :

Comptages automatiques par des méthodes non destructrices du contenant :

Certains appareils permettent de réaliser un comptage et une mesure des particules sans qu'il soit nécessaire de détruire le contenant.

• Le PROTOTHOR, décrit par DRAFTZ et GRAF (62, 99, 204), utilise le principe de la diffusion d'un rayon laser. Il présente cependant l'inconvénient de capter les bulles dans les liquides et les irrégularités à la surface du récipient. La concentration minimum détectable est de 1.000 particules par litre.

• Les COMPTEURS ROYCO permettent avec certains aménagements de compter et mesurer les particules au travers des flacons et des ampoules bouteilles.

2.2.3. METHODES D'OBSERVATION ET DE COMPTAGE PAR MICROSCOPIE DES PARTICULES.

2.2.3.1. Microscopie optique :

2.2.3.1.1. Généralités :

Nous aurions pu intituler ce chapitre : "méthodes d'étude des particules sur membrane". En effet, l'étude en microscopie optique nécessite de récupérer au préalable les particules sur une membrane. Pour tirer des informations de ces membranes chargées de particules, il est, bien entendu, possible d'utiliser la méthode gravimétrique (241) qui consiste à mesurer l'augmentation de poids de la membrane à la suite de la filtration du soluté, ou la méthode de mesure de l'indice de colmatage (173, 70).

Ces deux méthodes ne donnant qu'une idée générale de la contamination particulaire, elles n'offrent que peu d'intérêt ; seule l'observation des membranes en microscopie optique retiendra notre attention.

Qu'il s'agisse de microscopie photonique classique ou de microscopie à contraste de phase (62, 56), la méthodologie habituelle est la suivante : les particules sont recueillies par filtration sur une membrane

poreuse de surface connue, qui porte un quadrillage permettant de déterminer des aires de comptage. Dans un deuxième temps, cette membrane, rendue translucide si nécessaire, est examinée au microscope. Les modes opératoires permettant de réaliser cette étude microscopique ont été fréquemment décrits dans la littérature (2[illegible], [illegible]) et dans les documents diffusés par les fabricants de filtres (17[illegible], 1[illegible]).

Les filtres le plus couramment utilisés sont les membranes microporeuses en esters de cellulose (Millipore, Sartorius, Gelman).

Un autre type de filtre de développement plus récent, le filtre Nuclepore, présente l'avantage, en raison de sa faible épaisseur (10 µm), d'être transparent, ce qui évite d'être obligé de le recouvrir d'une huile pour le rendre transparent. Ce filtre est en polycarbonate.

Les filtres noirs se sont montrés plus pratiques à deux points de vue : d'une part, ils sont plus reposants pour l'oeil qu'un fond brillant mais, d'autre part, fait plus important, la majorité des particules mises en évidence jusqu'à ce jour sont brillantes et colorées ; le contraste est donc plus grand et l'observation plus aisée (9).

Les techniques d'observation et de comptage des particules sont au nombre de trois :

- examen visuel et comptage direct par l'opérateur ;
- photographie de l'image observée au microscope ;
- utilisation d'appareils de comptage automatique.

2.2.3.1.2. Examen visuel et comptage direct par l'opérateur (139, 53, 212) :

Dans ce cas, les particules sont comptées et classées en fonction de leur plus grande dimension. Le grossissement utilisé et la technique de comptage peuvent varier selon le degré d'évaluation que l'on désire obtenir et selon les utilisateurs. A titre d'exemple, on peut donner les indications suivantes :

- En utilisant le faible grossissement, on parcourt, en premier lieu, toute la surface de la membrane. Ce premier examen renseigne immédiatement l'opérateur sur le niveau moyen de

pollution de l'échantillon. En second lieu, une vérification rend certain que les particules sont distribuées de façon régulière à la surface de la membrane, ce qui est nécessaire pour un comptage statistique.

- Au petit grossissement (x 40 fois), les particules d'une taille supérieure à 50 µm et les fibres sont comptées et répertoriées suivant leur forme générale, puis classées en particules de 50 à 100 µm et supérieures à 100 µm. L'examen porte sur la totalité de la membrane filtrante.

- Si l'on veut apprécier le nombre de particules comprises entre 5 et 50 µm, on utilisera un grossissement de 100 fois et l'analyse portera sur un nombre limité de quadrillages du filtre pris au hasard ; par extrapolation, on déterminera le nombre de particules présentes dans la totalité du solide filtré. On classera les particules en deux catégories : de 5 à 25 µm, puis de 25 à 50 µm. Avec une grille plus petite et un grossissement plus important, on peut compter les particules de taille inférieure à 5 µm.

2.2.3.1.3. Photographie de l'image observée au microscope (275) :

Une analyse statistique du nombre et surtout de la taille des particules peut être facilitée par microphotographie du champ après étalonnage à partir d'un micromètre.

Cette méthode présente l'avantage de conduire à un document que l'on peut conserver et de rendre l'opération de comptage moins fatigante puisqu'elle se fait, à posteriori, sur les photographies.

Le seul inconvénient réside dans l'augmentation de temps, donc de coût, due au traitement des photographies.

2.2.3.1.4. [illegible] automatique : analyseurs d'images : (7[illegible]

Ils permettent l'exploitation automatique de l'image microscopique, sans avoir à tenir compte des importantes erreurs systématiques qu'un opérateur peut toujours commettre.

Le comptage et l'étude de la répartition granulométrique des particules peuvent être réalisés automatiquement grâce à des analyseurs d'images. Ces appareils permettent de travailler soit directement sur une projection ou une image télévisée du champ d'observation, soit indirectement sur document photographique.

Ils se composent d'un microscope sur lequel est montée une caméra couplée à un écran de télévision, à des modules d'ordinateur et à une calculatrice électronique.

L'échantillon étant placé sous la platine d'un microscope, son image agrandie est enregistrée par une caméra et projetée sur l'écran de télévision (le signal vidéo de la caméra est simultanément traité par des modules d'ordinateur) où l'image est balayée de façon classique, ligne par ligne. On étudie le signal vidéo de chaque ligne de façon à repérer l'endroit et la longueur de parcours où sa valeur est différente du niveau de base. L'information est stockée dans la mémoire de l'ordinateur. On recommence pour la ligne immédiatement inférieure et, lorsqu'on retrouve un signal vidéo qui change à peu près au même endroit avec une longueur de parcours voisine, l'ordinateur considère qu'en ce point existe une particule dont la largeur sera proportionnelle au nombre de lignes du balayage qui la rencontre. En réalité, les choses sont plus compliquées que cela, mais procèdent selon l'idée générale développée ci-dessus.

Les résultats des mesures et des comptages sont affichés à la partie supérieure de l'écran de télévision et peuvent être mis en mémoire dans des registres.

Des analyses détaillées peuvent être effectuées sur des particules prises isolément aussi bien que sur des champs entiers de particules. Le choix des modules d'ordinateur dépend de la complexité des analyses à effectuer.

Parmi les analyses habituelles réalisées à l'aide de ces appareils, il est possible :

- de mesurer des particules sélectionnées ou la totalité des particules d'un champ ;
- de répartir ces dimensions par catégorie et d'[illegible] :
  - une distribution des particules en fonction de leur taille,

. la longueur projetée d'une particule,

. la plus grande dimension d'une particule ;

- de calculer la dimension moyenne ;

. le classement des particules de taille supérieure à une dimension donnée.

Ce système permet la mesure du diamètre de la surface (Ds) et du diamètre projeté Feret (Dp).

Le système fonctionne à partir de 0.5 µm pour des images à fort contraste (particules très opaques), mais avec plus de difficultés pour les particules plus transparentes.

Les intérêts du système sont :

- l'automatisation de la microscopie manuelle, en réduisant la fatigue de l'observateur et les défauts d'interprétation (79) ;
- un traitement plus rapide et plus objectif des données du microscope (sa reproductibilité est évaluée à 2 %).

Parmi les appareils rencontrés sur le marché, nous citerons :

- Le QUANTIMET 720 - Société Imanco-Metal Research - qui, en raison de son électronique très importante, nous paraît constituer le plus perfectionné de ces appareils. Ses applications s'étendent bien au-delà du comptage des particules.
- Le µMC de Millipore est un appareil du même style, conçu essentiellement pour les problèmes de contamination particulaire. Il est signalé dans diverses publications (171, 174).
- L'INTEGRAMAT de Leitz a fait également l'objet de divers articles scientifiques.
- Coultronic a récemment proposé un lecteur d'image relativement simple par rapport aux appareils précédents : le TIMBRELL-COULTER SHEARICON (78).

2.2.3.1.2. Comptage .

C'est une méthode à la fois qualitative et quantitative.

Cette méthode est très intéressante car elle renseigne non seulement sur le nombre, mais aussi sur la taille réelle, la forme et, dans une certaine mesure,

sur la nature des particules ; elle peut donc révéler dans bien des cas la source de contamination (56, 62).

La mesure qui élutive est loin d'être aussi simple qu'il y paraît. La plupart du temps, il devient aléatoire de vouloir travailler au-dessous de 2 µm.

Cette méthode de mesure par filtration est théoriquement très sensible puisqu'elle est en même temps un procédé de concentration des particules. Cependant, quand on arrive aux liquides très propres, il faut parfois faire cette opération hors contamination, sans cela le bruit de fond apporté par l'environnement est supérieur à ce que l'on veut mesurer. On voit alors qu'il faut disposer d'une enceinte à empoussiérage contrôlé, ce qui augmente le coût des analyses.

Il est indispensable, pour ce type d'analyse, d'utiliser du matériel exempt de particules. A ce titre, MILLIPORE décrit une méthode de nettoyage de la verrerie à l'aide de solvants ultra-propres, filtrés sur membrane appropriée au moment de l'emploi.

2.2.3.2. Microscopie électronique :

2.2.3.2.1. Généralités :

Bien que le microscope électronique soit un instrument assez utilisé dans l'étude des particules atmosphériques (29, 30, 112), il n'a été que très rarement fait appel à lui en ce qui concerna la contamination particulaire des formes pharmaceutiques, et en particulier des solutés injectables (150, 182, 218, 252, 287).

D'une façon générale, les microscopes électroniques sont peu utilisés dans les disciplines de technologie pharmaceutique et en pharmacie galénique. C'est la raison pour laquelle il nous a semblé utile de procéder à un rappel des principes de cette méthode.

Nous étudierons successivement les deux types de microscope électronique :

- le microscope électronique à transmission (M.E.T.) ;
- le microscope électronique à balayage (M.E.B.).

PLANCHE n° 2

figure n° 6 : Comparaison des schémas de principe du microscope optique à projection et du microscope électronique à transmission.

figure n° 7 : Schéma d'un microscope électronique à transmission.

1 : canon à électrons

2 : faisceau d'électrons

3 : diaphragmes

4 : porte-objet

5 : condenseurs

6 : objectif

7 : projecteur

8 : lentille intermédiaire

9 : écran fluorescent

10 : boîtiers photographiques

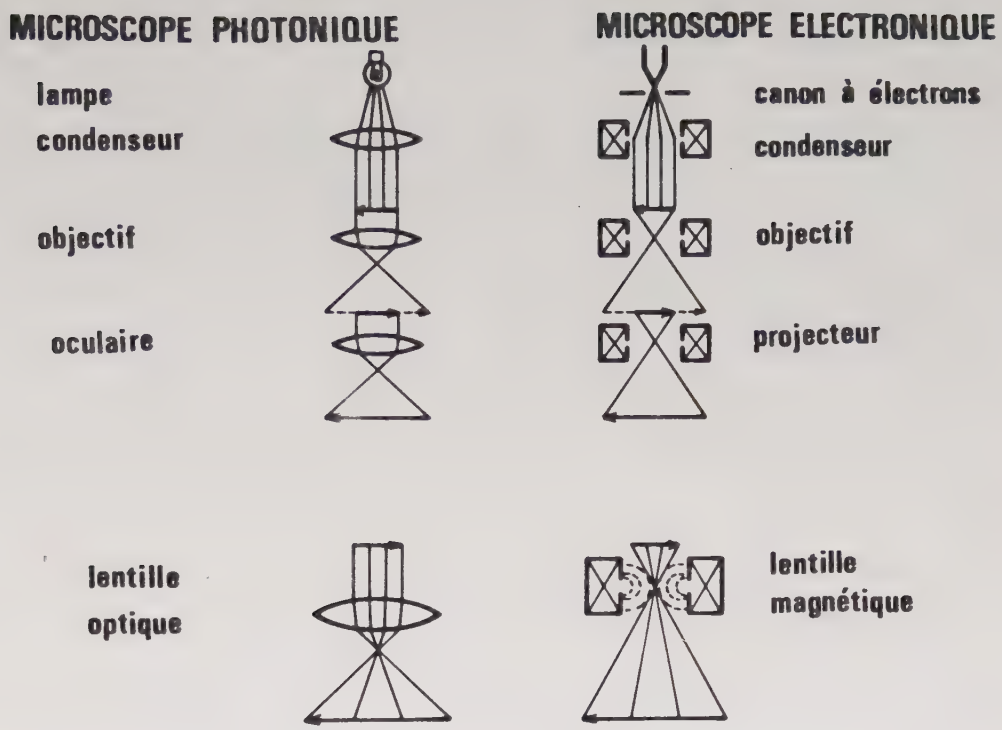
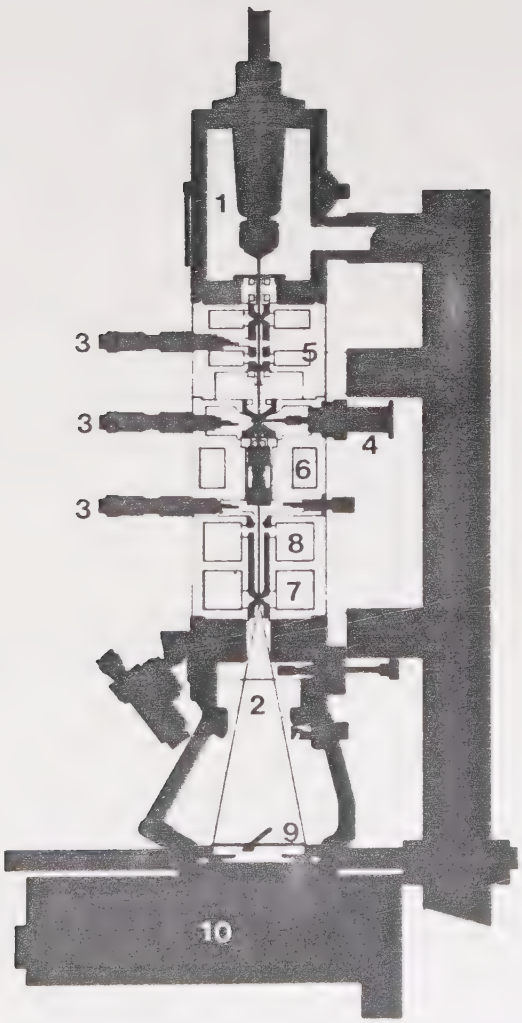


figure n° 6

figure n° 7



2.2.3.2.2. Le microscope électronique à transmission :

C'est le type le plus ancien de microscope électronique : mis au point au cours des années 30-40 ; depuis, il a progressé rapidement, et les appareils actuellement commercialisés allient à de très bonnes performances une grande facilité et une bonne sécurité d'emploi. En conséquence, ils peuvent être manipulés par des utilisateurs appartenant à des disciplines aussi nombreuses que variées, sans requérir de leur part des compétences techniques particulières.

2.2.3.2.2.1. Principe du microscope électronique à transmission (16, 91, 162, 213, 234) :

Pour exposer le principe de fonctionnement de cet appareil, il est d'usage d'établir un parallélisme avec le microscope optique à projection. Une telle étude comparée met en évidence des points communs et quelques différences fondamentales, comme l'illustre la figure 6.

• LES POINTS COMMUNS :

Comme le microscope optique à projection, le microscope électronique à transmission a pour but de faire traverser un échantillon mince par un rayonnement incident et d'observer sur un écran l'image projetée formée par le rayonnement transmis. Pour réaliser de tels dispositifs, il faudra donc disposer :

- d'une source d'éclairage donnant naissance au rayonnement ;
- d'un système de lentilles et de diaphragmes qui permettra de guider le rayonnement (dans l'un et l'autre cas, les lentilles ont des fonctions semblables et portent des noms identiques le plus souvent) ;
- d'un porte-objet, sur lequel on déposera l'échantillon mince ;
- d'un écran d'observation qui peut être remplacé, si besoin, par une émulsion photographique.

• LES DIFFERENCES :

Elles portent essentiellement sur les points suivants :

- Nature et source du rayonnement utilisé. Nous avons, dans un cas, une source lumineuse qui émet des photons ; dans l'autre cas, il s'agit d'un canon à électrons.
- Nature des lentilles. Dans le microscope électronique, on remplace les lentilles optiques par des lentilles magnétiques, c'est-à-dire que l'on dévie les électrons en leur appliquant un champ magnétique, lequel est réglable avec l'intensité du courant qui circule dans les bobines d'induction des lentilles.
- Enfin, en raison de la nature du rayonnement électronique, l'ensemble de la colonne du microscope électronique doit se trouver sous un vide d'environ 10^{-5} Torr pour permettre le cheminement des électrons le long de la colonne sans qu'ils aient à subir de déviation au contact des molécules gazeuses résiduelles.

2.2.3.2.2.2. Instrumentation :

Nous ne donnerons ici qu'une description sommaire des principaux organes d'un microscope électronique à transmission, illustrée par la figure 7.

Un microscope électronique à transmission comprend deux parties essentielles :

- la colonne ;
- les organes annexes.

Bien qu'il existe des différences d'un appareil commercial à l'autre, les points que nous aborderons ici peuvent être considérés comme représentatifs de la plupart des caractéristiques des appareils modernes.

2.2.3.2.2.2.1. L a c o l o n n e :

2.2.3.2.2.2.1.1. Le canon à électrons :

Il assure la production des électrons, leur accélération et leur concentration en un fin pinceau légèrement divergent. Il doit produire un faisceau homogène d'électrons émanant d'une surface aussi petite que possible.

Il existe plusieurs façons de provoquer une émission électronique ; malgré le développement actuel

des canons à émission de champ, nous nous bornerons ici à exposer le principe d'émission le plus employé : l'émission thermoélectronique, appelée encore thermoélectronique.

Un filament de tungstène en forme de V, de diamètre 0,1 mm environ, sert de cathode ; pour cela, il est relié au pôle négatif d'un générateur de haute tension, et se trouve donc fortement positif par rapport à l'anode.

Ce filament, chauffé sous quelques ampères, est porté par effet Joule à plusieurs milliers de degrés ; il émet ainsi des électrons qui sont accélérés sous le vide par la différence de potentiel établie entre la cathode et l'anode, puis dirigés dans la colonne du microscope.

2.2.3.2.2.2.1.2. Les lentilles :

Il existe deux types de lentilles électroniques :

- les lentilles électrostatiques ;
- les lentilles électromagnétiques, utilisées quasi exclusivement à l'heure actuelle.

Les microscopes électroniques à transmission n'ont pas tous le même nombre de lentilles. A partir du canon à électrons, on rencontre, le plus souvent, dans l'ordre suivant :

- le ou les condenseurs ;
- l'objectif ;
- les projecteurs.

• LE (OU LES) CONDENSEUR(S) : cette lentille assure le double rôle de concentrer le faisceau issu du canon sur une très petite surface de l'objet et de permettre un réglage continu de l'éclairage.

Actuellement, les microscopes électroniques de haute résolution utilisent la technique à double condenseur : la première lentille donne une image très réduite de la source, la seconde projette cette image sur la surface de l'objet en la réduisant encore si nécessaire.

Les condenseurs sont des pièces importantes, comme nous le verrons plus loin, pour réaliser la microanalyse d'un échantillon soit par diffraction d'électrons, soit par émission de rayons X.

• L'OBJECTIF : c'est une lentille de courte distance focale qui sert à donner la première image de l'objet. De la réussite de sa correction et de la perfection de sa réalisation dépend la qualité des résultats.

• LES PROJECTIFS : Les microscopes électroniques peuvent comporter de 2 à trois lentilles de projectifs :

- une lentille intermédiaire qui, par un jeu variés de grossissement et les conditions optiques requises pour la micro-diffraction ;
- la lentille finale de projection qui agrandit l'image formée par la lentille précédente à sa dimension définitive et la projette sur un écran fluorescent ou une plaque photographique.

2.2.3.2.2.2.1.3. La chambre-objet :

Elle permet d'assurer la diversité des mouvements et des conditions physiques de l'échantillon. Elle comprend deux éléments :

- une platine ;
- un porte-objet.

• LE PORTE-OBJET est destiné à supporter les grilles de microscopie électronique sur lesquelles on place les échantillons à observer.

2.2.3.2.2.2.1.4. La chambre d'observation et de photographie :

L'image finale est formée sur un écran fluorescent qui devient lumineux sous l'impact des électrons et permet ainsi de l'observer à travers des fenêtres de verre au plomb protégeant l'opérateur entre les rayons X émis par l'écran sous le bombardement électronique.

L'écran fluorescent, une fois retiré, laisse apparaître une plaque photographique ou un film, qui sont directement impressionnés par les électrons.

2.2.3.2.2.2.2. Les organes annexes :

• LES DISPOSITIFS D'ALIMENTATION ELECTRIQUE permettent le fonctionnement du générateur de haute tension, des circuits d'alimentation des lentilles et du filament.

• LA PRODUCTION ET L'ENTRETIEN DU VIDE : l'utilisation du M.E.T. exige un vide de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} Torr ; de plus, il est nécessaire que ce vide soit fréquemment supprimé, puis rétabli lors de diverses manoeuvres d'utilisation, de réglage et d'entretien. Il est donc nécessaire d'avoir un système de pompes rapides, faciles à commander et à contrôler.

En général, on utilise successivement trois types de pompes :

- une pompe à palettes qui assure un vide grossier ;
- une pompe à diffusion d'huile réalisant un vide poussé ;
- une pompe à diffusion de mercure assurant un vide ultime.

2.2.3.2.3. Le microscope électronique à balayage :

Le développement commercial de ces appareils est récent puisqu'il remonte à une dizaine d'années. Ce type de microscope est particulièrement adapté à l'observation des échantillons massifs, alors que le microscope électronique à transmission ne permet d'observer que les échantillons minces. Il fournit une image en relief de l'échantillon avec des renseignements topographiques détaillés.

2.2.3.2.3.1. Principe (77, 238, 276, 31) :

Pour bien souligner la différence qui existe entre le M.E.B. et le M.E.T., il convient de rappeler brièvement quels sont les principaux phénomènes qui se produisent au niveau d'un échantillon lorsque celui-ci est frappé par un faisceau d'électrons incidents. La figure 8 montre qu'à partir de l'impact du faisceau incident, un certain nombre de phénomènes se manifestent, et particulièrement l'émission de diverses radiations.

Chacun de ces rayonnements constitue un signal émis par l'échantillon et est porteur d'une information sur la nature de l'échantillon. On peut donc envisager d'étudier chacun de ces signaux pour mieux connaître l'échantillon.

Certains dispositifs commerciaux mettent en application ces phénomènes, et principalement :

- les rayons X qui, comme nous le verrons plus loin, permettent la micro-analyse par émission X ;

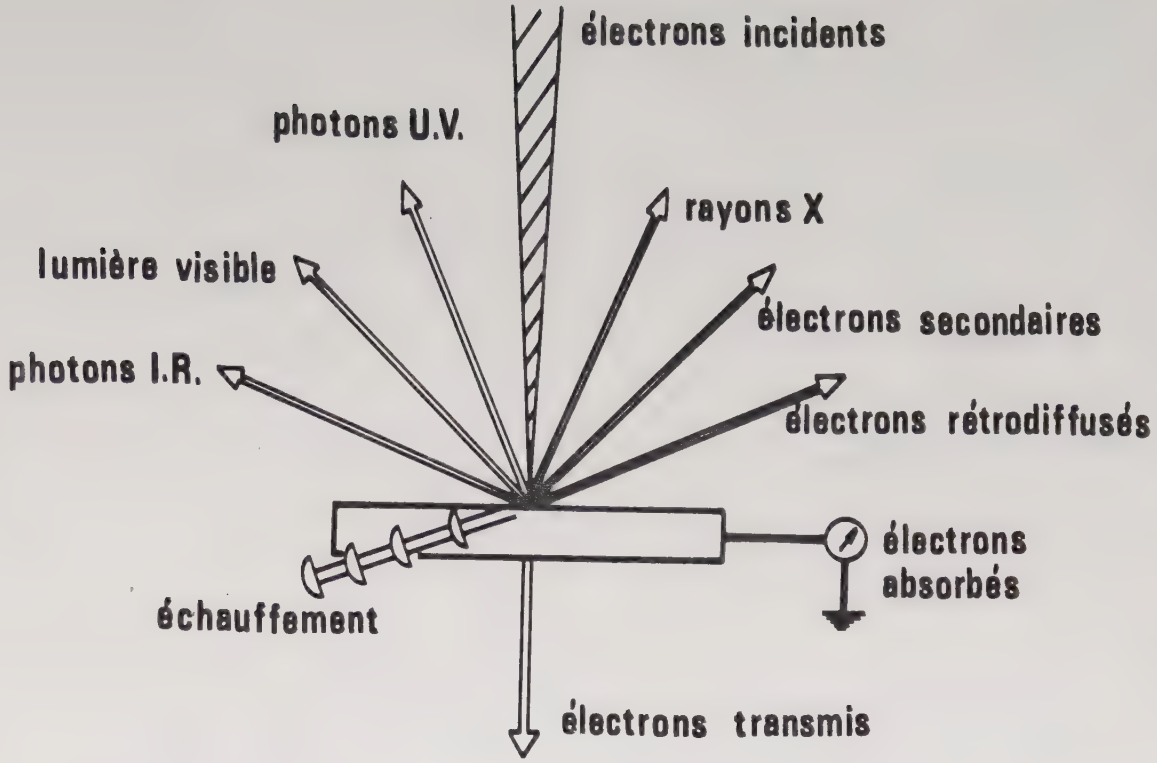


figure n°8

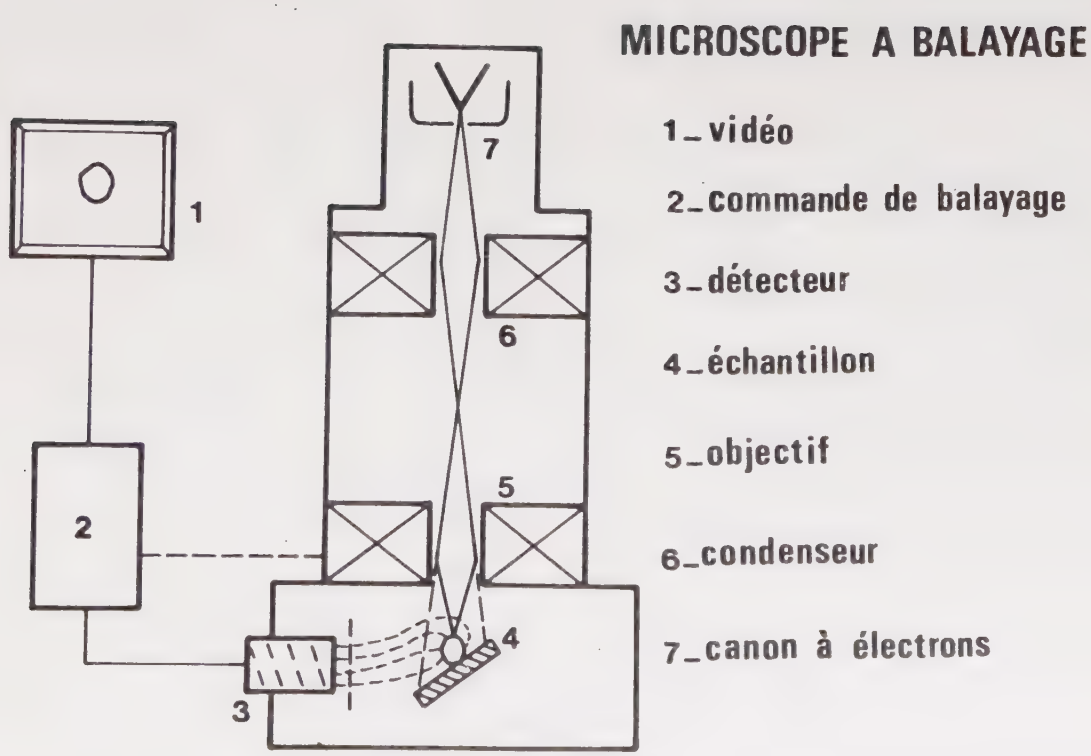


figure n°9

- les électrons transmis qui permettent la microscopie électronique à transmission et la microscopie électronique à balayage par transmission ;

- les électrons secondaires et les électrons rétrodiffusés qui sont, quant à eux, utilisés en microscopie à balayage :

  . les électrons rétrodiffusés sont les électrons renvoyés par la surface de l'échantillon lorsqu'il reçoit le faisceau incident ;

  . les électrons secondaires sont, eux, émis par les atomes qui constituent la surface de l'échantillon.

2.2.3.2.3.2. Instrumentation :

On imprime au faisceau d'électrons finement focalisé sur la surface de l'échantillon un mouvement de balayage très rapide, selon un motif de quadrillage régulier.

Chaque point de la surface frappé par le faisceau incident émet des électrons qui sont captés par un détecteur ; il en résulte un signal électrique qui est convenablement amplifié, puis révélé sur un écran cathodique. Le balayage de la surface de l'échantillon et le balayage de l'écran cathodique sont synchrones.

Les électrons émis suivent grâce à une grille chargée positivement une trajectoire incurvée, ce qui permet la visualisation des courbures, des arêtes, des trous et autres reliefs dont la position n'est pas dans la ligne de mire du détecteur. De plus, la brillance de l'image de l'écran cathodique est modulée par l'importance des signaux transmis par les différents points de la surface de l'échantillon. Ainsi, les arêtes ou les zones proches du détecteur émettant plus d'électrons apparaîtront plus brillantes sur l'écran vidéo que les zones concaves et éloignées du détecteur. Le résultat est une image que l'oeil humain interprète comme une image topographique en relief.

2.2.3.2.3.3. [illegible] :

Le tableau synoptique IV permet d'établir une comparaison simple de ces deux appareils.

Tableau I[4].

	MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE À TRANSMISSION	MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE
Spécimen	Mince (10 à 100 nm d'épaisseur) ; les électrons le traversent et en ressortent modifiés par sa structure interne.	Massif ; on balaye sa surface point par point avec un faisceau électronique très fin (1 à 10 nm de diamètre) dans un carré de 10 × 10 à 15 × 15 cm. On obtient par télévision des données sur sa structure superficielle.
Éclairement	Un faisceau large éclaire la totalité du champ de vision comme dans le microscope optique.	Un faisceau fortement concentré balaye le spécimen point par point.
Formation de l'image	Certains électrons sont dispersés au cours de la traversée du spécimen (de même qu'il y a absorption et réfraction de lumière dans un spécimen examiné au microscope optique). L'image est formée par des lentilles de concentration situées après le spécimen (comme dans le microscope optique).	Il y a production d'électrons secondaires à mesure que le faisceau balaye le spécimen point par point. Les électrons sont recueillis par un détecteur qui produit l'image. Il n'y a pas de lentille après le spécimen.
Observation de l'image	Après la dernière lentille, sur un écran fluorescent intérieur qui convertit directement les électrons en lumière.	Sur un écran de contrôle dont le balayage est synchronisé avec l'analyse du spécimen. La luminosité est modulée par un signal fonction du nombre d'électrons reçus par le détecteur.
Pouvoir séparateur	Déterminé principalement par la qualité et les aberrations de la première lentille de formation d'images. On obtient couramment un pouvoir séparateur d'environ 2 Å.	Essentiellement fonction de la finesse du faisceau électronique. On obtient couramment des pouvoirs séparateurs de 70 Å.
Contraste	Résulte de variations de la dispersion des électrons en différents points du spécimen, par suite de variations du numéro atomique et, ou de l'épaisseur du spécimen. Plus les atomes sont lourds ou plus le spécimen est épais en un endroit donné, plus l'image est sombre en ce point.	Résulte des variations de la production d'électrons secondaires d'un point à l'autre, par suite des variations de l'orientation de la surface par rapport au faisceau incident et au détecteur. L'image obtenue présente des parties claires et des ombres comme si le spécimen était éclairé latéralement.
Type d'information	En général, bidimensionnelle avec des indications sur la composition. On obtient parfois une information tridimensionnelle sur des structures très petites.	Généralement tridimensionnelle par suite du type de contraste qui résulte de la configuration de la surface. On emploie fréquemment la stéréoscopie pour accentuer cet effet.
Photographie	S'effectue à l'intérieur. L'image électronique tombe directement sur l'émulsion, sans conversion intermédiaire en lumière.	S'effectue à l'extérieur, directement à partir de l'écran de contrôle. On prend fréquemment des photographies Polaroid pour disposer rapidement des résultats.

Finalement, bien qu'apportant des informations morphologiques différentes, ces techniques se révèlent beaucoup plus "performantes" que les microscopes optiques, tout en permettant de réaliser le même type de travail :

- comptage direct des particules sur l'écran ;
- comptage sur document photographique ;
- comptage automatique grâce à un analyseur d'images relié directement au microscope.

2.2.3.3. Corrélation entre les comptages microscopiques et instrumentaux de particules :

Nous venons de voir la diversité des méthodes d'étude des particules et le grand nombre de résultats de comptage d'échantillons réalisés par ces méthodes et qui ont été publiés. Il paraît, dans ces conditions, légitime de se demander dans quelle mesure il est possible de comparer des résultats obtenus avec des méthodes dont les principes de comptage sont différents (123, 284, 60).

- la méthode microscopique définit la taille comme la plus grande dimension linéaire ;
- le compteur à diffusion de lumière définit la taille comme le diamètre d'un cercle de même section ;
- le compteur Coulter comme le diamètre d'une sphère de même volume.

On remarque qu'une particule sphérique donne le même nombre de comptages quelle que soit la définition employée pour la mesure, ce qui explique pourquoi tant de matériaux étalons proposés sont sphériques. Si, alors, on mesure des particules ayant des formes nettement différentes de celles des particules étalons, les résultats numériques peuvent différer bien que chaque méthode instrumentale fonctionne parfaitement.

Il [illegible] dans la mesure de la dimension se produira dans le cas extrême d'une longue fibre fine. Par exemple, une [illegible] de 150 µm de long, 10 µm de large et 2 µm d'épaisseur, sera mesurée au microscope à 150 µm, au H.I.A.C. à 43 µm et au Coulter à 8 µm (123).

Malheureusement, la plupart des particules rencontrées dans des solutés injectables pharmaceutiques ne sont pas sphériques, même si les fibres telles que celle que nous venons de donner en exemple sont sûrement une réalité (191) et, à cause de leur longueur, sont facilement détectables par les méthodes d'inspection visuelle (272).

HOPKINS (123) donne sur ce sujet quelques indications intéressantes dans une étude comparative de trois techniques optiques, du compteur Coulter et du compteur H.I.A., sur des solutions salines intra-veineuses du commerce. Les comparaisons de ces trois techniques pour un fluide hydraulique avaient été précédemment publiées et ont montré un accord raisonnable entre les comptages. HOPKINS conclut de son étude que les méthodes instrumentales sont comparables aux lectures microscopiques à condition de diminuer les risques de souillures et de prendre des précautions pour éliminer les bulles d'air. Cependant, une corrélation parfaite entre ces trois méthodes demeure impossible.

WALKER (280, 279), par contre, émet un jugement beaucoup plus sévère sur les possibilités de corrélation entre les divers résultats et accorde une préférence très marquée aux méthodes microscopiques.

2.2.4. METHODES D'ANALYSE DE LA CONSTITUTION CHIMIQUE DES PARTICULES.

2.2.4.1. Introduction :

Nous avons étudié jusqu'à présent des méthodes de comptage et d'observation des particules ; parmi celles-ci, seules les techniques de microscopie optique et électronique permettent à l'observateur de se faire une idée sur la nature des contaminants particulaires. Ces méthodes d'identification (228, 48) sont basées, comme nous l'avons vu, sur l'examen des propriétés morphologiques et optiques des particules. Avec une bonne habitude, de bons témoins et des précautions suffisantes, il est possible d'en tirer des renseignements qualitatifs intéressants sur la nature des particules, ce qui peut éventuellement permettre d'en découvrir l'origine et, par là-même, de supprimer la source de contamination. Cependant, dans la mesure où on désire

avoir une connaissance plus objective de la nature des contaminants particulaires, il est nécessaire de recourir à des études analytiques pour connaître la constitution chimique de l'échantillon.

Nous nous proposons de faire un recensement rapide des principales méthodes analytiques auxquelles on peut faire appel pour connaître la constitution chimique des particules. Ces méthodes ont été mises au point pour la plupart à propos de l'étude des particules dans les atmosphères ou les liquides hydrauliques. Leur application à l'étude des contaminants particulaires des médicaments est, à notre connaissance, peu développée jusqu'à présent, bien que signalée par certains auteurs (187, 42, 19, 175, 287, 200).

2.2.4.2. Généralités et terminologie :

Il nous est apparu nécessaire, avant toute chose, de préciser avec exactitude la terminologie que nous allons employer pour décrire et classer les méthodes d'étude analytique des contaminants particulaires.

Suivant que l'analyse porte sur l'ensemble des particules, ou sur chaque particule isolée, les méthodes d'étude analytique peuvent se subdiviser en deux grands groupes :

- les méthodes de "macro-analyse particulaire" ;
- les méthodes de "micro-analyse particulaire".

• Nous regroupons sous le terme de "MACRO-ANALYSE PARTICULAIRE" les techniques permettant d'obtenir la composition chimique globale de l'ensemble des particules de l'échantillon étudié, c'est-à-dire la nature et éventuellement les pourcentages ou quantités respectives des différents éléments rapportés au pool particulaire dans sa totalité.

• Sous le terme de "MICRO-ANALYSE PARTICULAIRE", nous désignons les techniques permettant de connaître [illegible] individuellement.

Dans un deuxième temps, on peut introduire un autre critère de classification des méthodes analytiques : leur principe.

En règle générale, l'étude analytique d'un échantillon peut être réalisée selon deux grands types d'analyse :

- l'analyse chimique ;
- l'analyse instrumentale.

En fonction de ces deux critères de classification, nous distinguerons donc quatre groupes de méthodes d'analyse particulaire :

- la macro-analyse chimique particulaire ;
- la micro-analyse chimique particulaire ;
- la macro-analyse instrumentale particulaire ;
- la micro-analyse instrumentale particulaire.

Il faut enfin signaler un autre critère de classification : l'effet de la méthode employée sur l'intégrité de l'échantillon.

En effet, certaines de ces méthodes d'analyse particulaire sont destructrices de l'échantillon, les autres ne le sont pas. Il sera, bien entendu, avantageux, lorsqu'on possède une faible quantité d'échantillon, de faire appel à une méthode non destructrice d'analyse particulaire.

2.2.4.3. Macro-analyse chimique particulaire :

Ce type de méthode est simple dans son principe puisqu'il suffit, après avoir isolé les particules contenues dans le soluté injectable, d'utiliser une méthode de recherche et d'identification systématique des éléments chimiques. Elles reposent sur l'usage de réactions colorées hautement sensibles. Elles comportent des risques certains d'erreur par interférence de couleur lorsque les particules sont de composition chimique complexe (alliages).

Ces méthodes peuvent être réalisées sur les membranes de filtration elles-mêmes et selon des techniques parfaitement codifiées, dont une des plus connues est celle du "four annulaire" (175, 212, 187, 230, 166).

2.2.4.4. Macro-analyse chimique particulaire :

Elle consiste en l'application des méthodes chimiques précédentes à l'analyse individuelle des particules. Ainsi, pour les particules supérieures à 10 µm, on peut réaliser la technique du "four annulaire" combinée à la microscopie optique. Les réactions chimiques sont alors observées sur des particules individuelles en microscopie à fond noir, la réaction apparaissant visible comme un halo autour de la particule (102, 19, 175, 266).

Ces techniques permettent de détecter des traces de 10^{-8} à 10^{-12} g.

2.2.4.5. Macro-analyse instrumentale particulaire :

Ce sont des méthodes spectroscopiques qui, en mesurant l'absorption, l'émission ou la diffraction des rayonnements par les particules étudiées placées dans des conditions données, permettent de connaître la composition du pool particulaire dans son ensemble.

- SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION :

L'étude du pool particulaire peut être réalisée par diverses techniques de spectroscopie d'ab[illegible] :

- Spectroscopie I.R. (109).
- Spectrophotométrie et colorimétrie U.V. et visible.

Par exemple, l'analyse de la silice se fait par photométrie à 820 nm et permet d'évaluer la présence de particules de verre dans un échantillon (76).

- SPECTROSCOPIE D'EMISSION :

- Photométrie de flamme.
- Spectroscopie d'émission d'arcs (175).

- Spectroscopie de fluorescence X, méthode très utilisée pour l'étude des nanofibres (287).

c SPECTROSCOPIE DE DIFFRACTION :

- Diffraction des rayons X.
- Diffraction d'électrons.

2.2.4.6. Micro-analyse instrumentale particulaire :

C'est ce type de méthode analytique des particules que nous voudrions plus spécialement inciter. En effet, elle permet d'étudier qualitativement ou quantitativement la composition chimique individuelle des particules contaminantes.

Cela suppose la possibilité de repérer et de sélectionner la particule que l'on désire analyser ; c'est pourquoi, elle nécessite l'utilisation conjointe d'un système d'analyse instrumentale et d'un système d'observation microscopique optique ou électronique, ce qui permet de réaliser une analyse ponctuelle.

Les systèmes de spectroscopie utilisés dans le cas de la micro-analyse instrumentale particulaire sont :

- la diffraction d'électrons ;
- la spectroscopie d'émission de rayons X.

Le premier appareil de micro-analyse instrumentale par spectroscopie d'émission X a été mis au point par CASTAING en 1953 (36) et est connu sous le nom de microsonde de CASTAING, ou microanalyseur à sonde électronique.

Cet appareil, représenté sur la figure 10, fonctionne selon le principe suivant (11, 24, 220) :

- un échantillon, que l'on peut observer à l'aide d'un microscope optique, est bombardé par un faisceau d'électrons concentré en un point d'environ 1 µm de diamètre. Sous l'influence de ce faisceau d'électrons, l'échantillon émet des rayons X qui sont analysés en longueur d'onde et intensité par un spectromètre à cristaux et un compteur proportionnel.

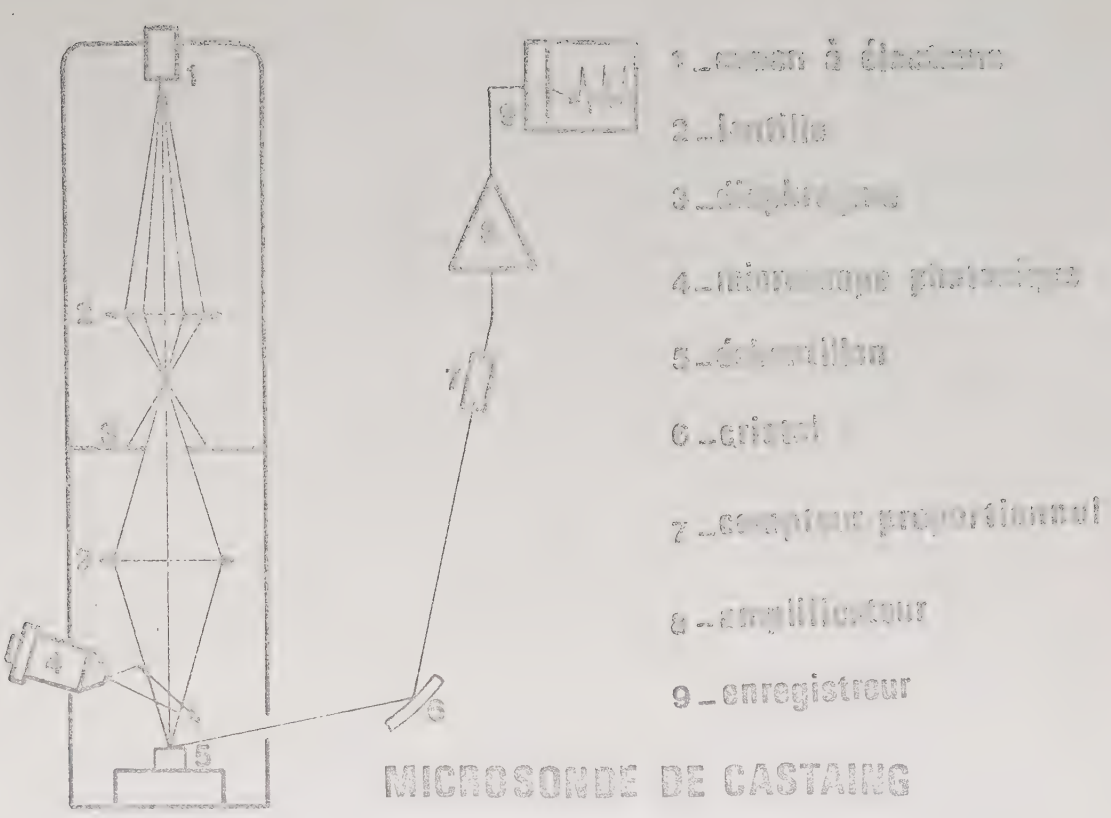

1
2
3
4
5
6
7
8
9
MICROSONDE DE CASTAING

figure n°10

série L2
série L1
série L3
série K

Par la suite, la micro-analyse instrumentale n'a cessé de faire des progrès grâce au développement conjoint de la microscopie électronique et de la spectrométrie X. D'une part, le microscope optique, utilisé au départ sur la sonde de CASTAING, a été remplacé par les microscopes électroniques dont le faisceau d'électrons servait alors simultanément à la formation de l'image et à l'émission des rayons X, devenant ainsi des "microscopes électroniques analytiques" ; d'autre part, l'analyse spectroscopique des rayons X en fonction de leur longueur d'onde (système dispersif) voyait naître un système nouveau, plus rapide : la spectroscopie en Energie (système non dispersif), dans laquelle le spectromètre classique est remplacé par un détecteur solide au Silicium-Lithium, relié à un analyseur multicanaux.

Le Centre de Microscopie Electronique de l'Institut Pasteur étant orienté vers l'étude des particules par microscopie électronique analytique, nous allons présenter en détail cette technique dont les applications à l'étude des particules dans les médicaments sont toutes récentes.

2.2.4.6.1. Principe de la microscopie électronique analytique (248, 249) :

On distingue deux phases :

- la production des rayons X par bombardement électronique d'un petit volume de l'échantillon (de l'ordre de 1 µm) ;
- l'analyse spectrale du rayonnement X.

• EMISSION DES RAYONS X :

Nous avons vu précédemment que lorsque le faisceau primaire d'un microscope électronique heurte l'échantillon observé, il produit au point d'impact des effets divers qui peuvent être utilisés pour obtenir une information sur l'échantillon.

Nous nous intéresserons uniquement ici au mécanisme de formation des rayons X.

Lorsqu'un électron du faisceau incident, émis par le filament du microscope et accéléré sous une différence de potentiel, heurte un atome constitutif de la cible, il est chargé d'une certaine énergie cinétique qu'il communique à l'atome, le faisant passer de l'état fondamental à l'état excité en expulsant un électron des couches profondes.

L'état excité est peu stable et le retour à l'état fondamental se fait immédiatement par transition d'un électron des couches externes vers l'orbite libre.

La figure 11 présente certaines de ces séries de transition possibles (K, L, M, etc...).

Chaque transition s'accompagne d'une libération d'énergie sous la forme d'un photon X. Les rayons X émis ont une longueur d'onde, et donc une énergie, fonction de la transition électronique, c'est-à-dire, finalement, caractéristique de la structure électronique des atomes constituant la zone de l'échantillon bombardée par le faisceau d'électrons.

• DETECTION ET ANALYSE SPECTRALE DES RAYONS X :

Il existe deux méthodes de détection et d'analyse des rayons X :

- la spectrométrie en longueur d'onde (système dispersif) ;
- la spectrométrie en énergie (système non dispersif) - (221, 111, 65).

La détection et l'analyse des rayons X en longueur d'onde (spectrométrie dispersive) sont basées sur l'utilisation de la relation de BRAGG. Les rayons X émis par la cible, en fonction de leur angle d'arrivée sur le cristal analyseur du spectromètre, subissent une diffraction, puis sont détectés par un compteur proportionnel à ionisation de gaz. L'angle de diffraction permet de calculer la longueur d'onde des rayons X.

Dans le cas de l'analyse des rayons X en énergie (spectrométrie non dispersive), les rayons X émis par la cible sont dirigés sur un détecteur au Silicium-Lithium. Ce détecteur est un disque de Silicium pur dans lequel on a fait diffuser des atomes de Lithium afin de supprimer toute irrégularité dans la structure du cristal qui puisse bloquer les électrons (figure 12).

Chaque photon X perd son énergie dans le détecteur en produisant dans les atomes de Silicium une averse de photo-électrons, c'est-à-dire libérant des charges électriques dont le nombre est proportionnel à la perte d'énergie du photon. Un préamplificateur à transistor à effet de champ (figure 13) transforme cette impulsion de courant en une impulsion de tension.

MICRO-ANALYSEUR EDS [illegible]

1_vase [illegible]

2_azote liquide

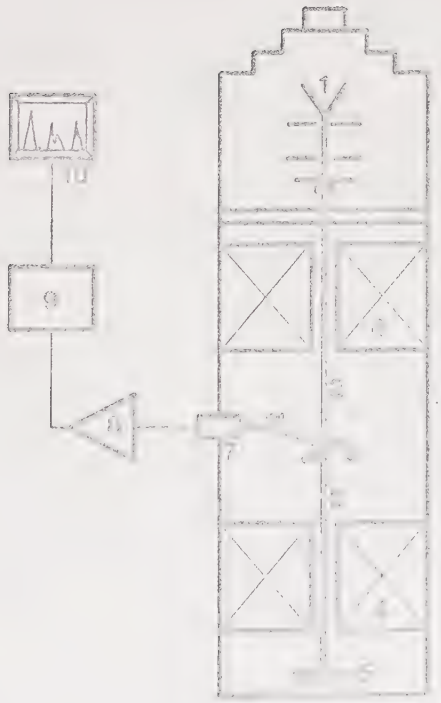
3_préamplificateur

4_collimateur

5_fenêtre de béryllium

6_détecteur Si(Li)

figure n° 12



MICROSCOPE ELECTRONIQUE ANALYTIQUE A TRANSMISSION

1_canon à électrons

2_électrons incidents

3_électrons transmis

4_lentilles électromagnétiques

5_écran fluorescent_plaque photographique

6_[illegible]

7_détecteur Si(Li)

8_amplificateur

9_analyseur multicanaux

10_[illegible] kV

11_[illegible]

figure n° 13

Les impulsions sont ensuite analysées en amplitude par un sélecteur multicanaux, puis stockées dans des mémoires, canal par canal, et transcrites sur un écran cathodique sous forme d'un spectre de coups en fonction de l'énergie.

2.2.4.6.2. Possibilités pratiques de la microscopie électronique analytique :

Il convient, en premier lieu, de signaler que la microscopie électronique analytique peut se réaliser aussi bien avec un microscope à balayage qu'avec un microscope à transmission.

La spectrométrie en énergie ne permet pas de détecter les éléments de numéro atomique inférieur à 11 (Sodium) qui émettent des rayons X dotés d'une énergie trop faible pour pouvoir traverser la fenêtre de Beryllium qui protège le cristal de Silicium-Lithium. Aussi, des éléments comme C, N, O et H qui sont les constituants essentiels des particules organiques ne peuvent être détectés. Sur ce point, la micro-analyse en longueur d'onde est plus avantageuse puisqu'elle permet de détecter les éléments précédents.

Un des gros avantages de la micro-analyse en énergie par rapport à la micro-analyse en longueur d'onde est la rapidité de l'analyse. Un échantillon peut ainsi être analysé en moins d'une minute, tous les pics du spectre grandissant simultanément au fur et à mesure que les rayons X sont détectés. Une analyse en longueur d'onde demanderait un temps d'analyse plus long correspondant à la recherche, par déplacement du cristal, des angles de diffraction des rayons X correspondant aux éléments présents dans l'échantillon.

La micro-analyse en énergie permet d'obtenir, comme la micro-analyse en longueur d'onde, des résultats qualitatifs et quantitatifs.

L'analyse quantitative repose sur l'intégration des aires sous la courbe des différents pics. C'est un travail qui est réalisé automatiquement par l'analyseur multicanaux ; il reste ensuite à comparer les valeurs de ces différentes intégrales entre elles et par rapport à des témoins. Cette partie du travail est très longue si on ne dispose pas d'un matériel de traitement automatique des données, ce qui est notre cas.

3. METHODES D'ETUDE DE LA CONTAMINATION PARTICULAIRE DES FORMES PHARMACEUTIQUES AUTRES QUE LES PREPARATIONS INJECTABLES

Les poudres, les collyres, les sirops, les pâtes, etc..., ne relèvent pas directement des méthodes décrites ci-dessus. Cependant, on peut s'y ramener sans trop de difficultés.

Pour isoler les particules, il s'agit toujours de passer en milieu liquide et de traiter ensuite, le plus souvent, par filtration sur membrane microporeuse. Il faut, en règle générale, songer aux points suivants :

- un liquide visqueux peut devenir fluide si on le chauffe suffisamment ;
- il peut exister un solvant simple qui fluidifie le sirop ou la pâte. De même, pour les pommades, GUICHARD (102) suggère le myristate d'isopropyle, tandis que BRUNZELL (28) propose une méthode semblable de récupération des particules métalliques ;
- dans le cas des émulsions, on peut émulsifier en utilisant de préférence un agent non ionique.

La détection des fibres d'amiante dans le talc est un cas particulier intéressant.

Les méthodes analytiques rapportées dans la littérature et qui sont applicables à la différenciation de ces deux minéraux sont essentiellement (158, 217, 183) :

- la diffraction de rayons X, sensible au mieux à des niveaux de 1 % de concentration en amiante ;
- la microscopie optique ;

- la spectrométrie d'absorption atomique, d'efficacité limitée par la présence d'atomes semblables dans le talc et l'amiante ;
- la spectrométrie Infra-Rouge ;
- l'analyse thermique différentielle ;
- l'analyse thermogravimétrique ;

  ces deux dernières, grâce à la possibilité de fournir une information sur les changements cristallographiques se produisant pendant le chauffage sont très utilisées pour caractériser les minéraux ;
- la microscopie électronique analytique, soit par spectrométrie X, soit par diffraction d'électrons.

Troisième Partie

APPLICATION DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ANALYTIQUE

A L'ETUDE DES CONTAMINANTS PARTICULAIRES

DE DEUX FORMES GALENIQUES :

- PREPARATIONS INJECTABLES : étude qualitative des particules

- TALCS : recherche de l'amiante

1. INTRODUCTION

Les microscopes électroniques permettent de compter le nombre de particules présentes dans un échantillon, et d'en établir la répartition granulométrique, de la même façon que les microscopes optiques. Ces appareils apportent, en outre, l'avantage d'un grossissement plus élevé et d'un meilleur pouvoir de résolution, ce qui permet d'observer sans difficultés les particules de petite taille. Nous n'avons cependant pas orienté notre travail vers l'obtention de résultats quantitatifs, d'une part, parce que de nombreux travaux en ont déjà fait l'objet, du moins en ce qui concerne les particules supérieures au micromètre, mais surtout parce qu'un tel travail nécessite, pour être efficace, de disposer d'un analyseur d'image relié au microscope électronique.

Nous nous sommes, par contre, plus spécialement intéressé au contrôle et à l'analyse qualitative des particules que nous observions, grâce aux possibilités de micro-analyse offertes par l'équipement dont nous disposions.

Nous avons ainsi été amené, dans un premier temps, à mettre au point à partir du matériel existant au Centre de Microscopie Electronique de l'Institut Pasteur de Lyon, lequel est principalement orienté vers des problèmes d'ordre biologique, une méthode d'étude qualitative des particules en microscopie électronique analytique.

Les échantillons que nous avons ensuite soumis à l'analyse sont de provenances diverses et peuvent donc paraître hétérogènes en raison de la diversité des laboratoires qui nous les ont proposés. C'est pourquoi, notre travail nous semble, avant tout, être un travail de mise au point méthodologique qui devrait permettre ultérieurement, lorsque des analyses plus nombreuses et systématiques auront été pratiquées, de déboucher sur des résultats ayant une valeur statistique réelle.

2. MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE D'ETUDE DE LA CONTAMINATION PARTICULAIRE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ET MICRO-ANALYSE

2.1. DESCRIPTION ET REFERENCES DU MATERIEL ANALYTIQUE UTILISE -

Nous avons utilisé le matériel lourd suivant, dont nous allons décrire les principales caractéristiques.

2.1.1. MICROSCOPE ELECTRONIQUE ANALYTIQUE A TRANSMISSION.

Cet appareil résulte du couplage d'un microscope à transmission PHILIPS EM 300 et d'un micro-analyseur en énergie des rayons X, EDAX 707 B.

2.1.1.1. Caractéristiques techniques spécifiques du microscope PHILIPS EM 300 :

Cet appareil est équipé entre autres :

- d'un canon à émision thermo-ionique fonctionnant sous des tensions d'accélération de 20, 40, 60, 80 et 100 KV ;
- d'un système "d'éclairage" de l'échantillon à double condenseur, permettant de focaliser le faisceau d'électrons incidents sur une surface ponctuelle de moins de 1 µm de diamètre ;

- d'une platine porte-objet goniométrique, permettant l'inclinaison à ± 60° du porte-objet autour d'un axe horizontal ;
- d'un dispositif de décontamination de la colonne à l'azote liquide qui capte préférentiellement les poussières contaminantes, évitant ainsi qu'elles ne se déposent sur les pièces importantes de la colonne ou sur l'échantillon. La plupart de ces poussières sont des particules de carbone provenant du crackage, sous le faisceau d'électrons, des vapeurs d'huile remontées des pompes ;
- d'un dispositif de prise de vues par plaques photographiques.

2.1.1.2. Caractéristiques techniques spécifiques du micro-analyseur EDAX 707 B :

La planche 4 montre l'analyseur et les principales commandes qui en dirigent les fonctions.

L'analyseur multicanaux est constitué de 800 canaux répartis en deux mémoires de 400 canaux.

Il est possible de programmer la durée d'une analyse :

- en fonction du temps ;
- en fonction de la hauteur des pics d'émission ;
- en fonction de l'intégrale des pics d'émission.

Il est possible de mesurer, à l'aide de 80 fenêtres réglables, l'intégrale de chaque pic constituant un spectre et d'obtenir un affichage de ces valeurs sur l'écran vidéo.

L'interprétation des spectres se fait grâce au module d'identification des pics qui compare la position de chaque pic sur l'échelle d'énergie avec la position des raies K, L et M des divers éléments du tableau périodique.

Il est possible de choisir la gamme d'énergie sur laquelle on désire réaliser l'analyse. Les possibilités sont les suivantes :

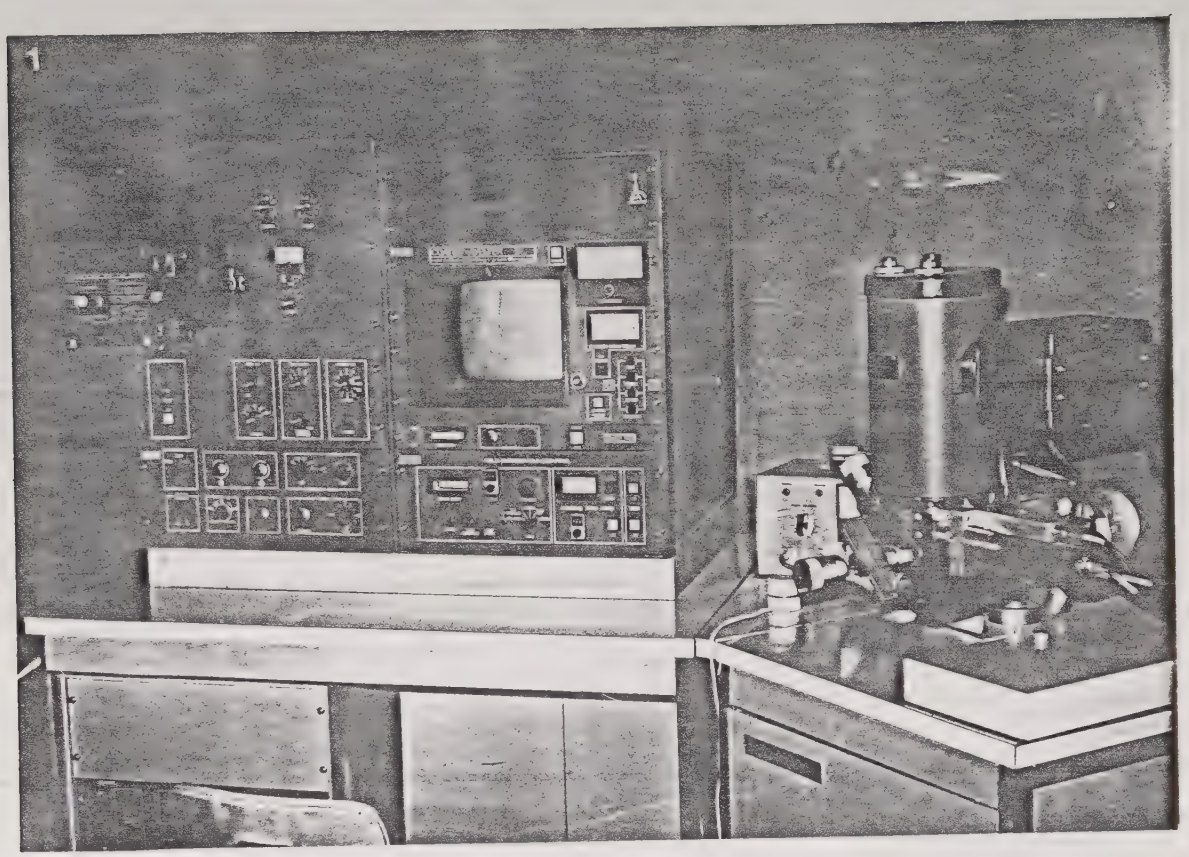
Gamme d'énergie en keV	Nombre d'électrons volts par canal	Nombre de mémoires disponibles
0 - 4	10	2
0 - 8	20	2
0 - 16	20	1
4 - 12	20	2
8 - 16	20	2
12 - 20	20	2
0 - 20	50	2
0 - 40	50	1
0 - 40	100	2

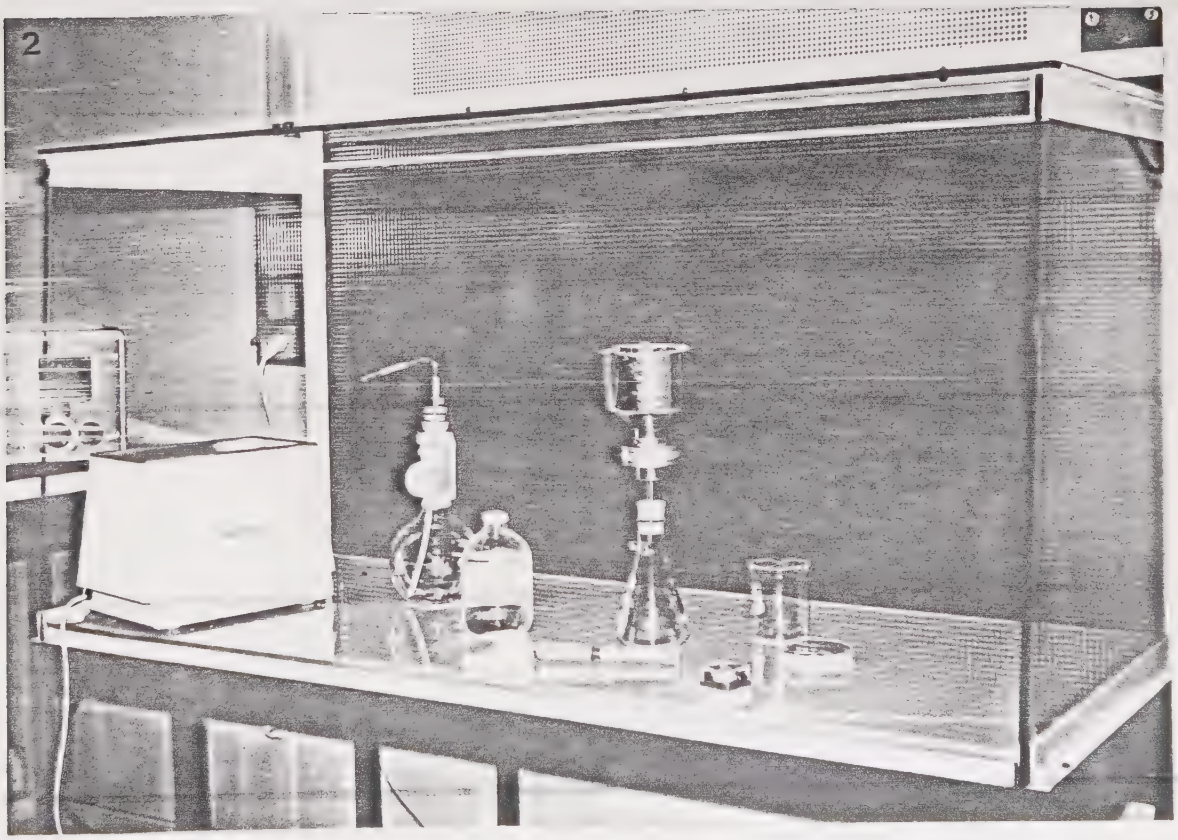
Il est possible de comparer par superposition des images sur l'écran vidéo le spectre contenu dans chaque mémoire lorsqu'on a choisi une gamme d'énergie à deux mémoires.

PLANCHE n° 3

Photographie n° 1 : Microscope Electronique à Balayage. Coates and Welter modèle 100 à canon à émission de Champ.
(Appareil du Centre de Microscopie Electronique et de Pathologie Ultrastructurale de l'Institut Pasteur de Lyon).

Photographie n° 2 : Plan de travail sous hotte à flux d'air laminaire horizontal (Département de pharmacie galénique, U.E.R. de pharmacie de Lyon).


1


2

2.2. METHODES DE PREPARATION DES ECHANTILLONS -

2.2.1. DESCRIPTION DU POSTE DE TRAVAIL.

L'étude de la contamination particulaire des médicaments nécessite de respecter certains impératifs au niveau de la préparation des échantillons afin, en particulier, d'éviter de les contaminer par d'autres particules. Plus la quantité de particules contenues dans l'échantillon est faible, plus la présence de particules provenant d'une contamination de l'échantillon lors de sa préparation fausse les résultats.

Le poste de travail que nous avons organisé était constitué des éléments suivants :

- Une hotte à flux d'air laminaire horizontal E.S.I. appartenant à la classe 100 de propreté d'air, c'est-à-dire pour laquelle le nombre de particules supérieures ou égales à 0,5 µm ne doit pas dépasser un total de 100 par pied cube d'air.
- Un bac de nettoyage à ultra-sons MILLIPORE de capacité de travail 2 litres - fréquence : 55 KHz.
- Un distributeur de solvants filtrés MILLIPORE.
- Un chalumeau (oxygène - acétylène).
- Divers matériels de filtration MILLIPORE :
  . supports divers de diamètre variable ;
  . filtres en esters de cellulose de porosité et diamètres variés.

2.2.2. CONTROLE DE L'EFFICACITE DE LA HOTTE.

Diverses normes d'origine américaine proposent des méthodes de contrôle de l'efficacité des hottes (184, 185, 188, 189, 147, 176).

N'ayant pas à notre disposition de compteur à diffusion de lumière pour contrôler les particules supérieures ou égales à 0,5 µm et inférieures à 5 µm comme le recommandent ces normes, nous avons choisi de réaliser ce contrôle en plaçant dans le poste de travail une tête de captage munie d'un filtre MILLIPORE de 0,45 µm de porosité en esters de cellulose et relié à une pompe selon le dispositif décrit par CHAMBON et coll. (39). Ce filtre, après une durée de prélèvement de 36 heures, soit un volume de 54 m^3, a été divisé en deux parties :

- l'une a été observée au microscope optique ;
- l'autre a été observée en microscopie électronique selon la méthode décrite plus loin.

Nous avons constaté que le nombre de particules recueillies par la tête de captage pendant un temps près de 30 fois supérieur au temps de travail nécessaire à préparer un échantillon est très faible. Les très peu nombreuses particules de taille supérieure à 1 µm collectées sur le filtre témoin sont essentiellement constituées de silicium.

Malgré la présence de particules supérieures à 5 µm qui montre que la hotte ne répond pas aux limites de la classe 100, nous avons cependant admis

que la hotte remplissait bien le rôle que nous en attendions et que les quelques particules libérées ne sont pas de nature à fausser les résultats des analyses.

2.2.3. TECHNIQUE PROPRE DE PREPARATION DES ECHANTILLONS - NETTOYAGE DU MATERIEL.

La plupart des auteurs ayant travaillé sur la contamination particulaire ont mis en évidence la nécessité de travailler avec un matériel de préparation qui soit "le plus propre possible". Nombreuses sont donc les publications qui proposent une méthodologie de "travail propre" (18, 68, 167, 278, 251).

Nous nous sommes inspiré de ces méthodes pour mettre au point les précautions suivantes :

- Tout le matériel utilisé a été nettoyé par des solvants de lavage préalablement filtrés sur membrane MILLIPORE de 0,8 µm et avec l'aide des ultra-sons. Dans l'ordre d'utilisation, les solvants de nettoyage sont :
  - . eau distillée,
  - . éthanol R.P.,
  - . Forane 113 U.K.
- Les solvants utilisés pour la préparation des films supports de microscopie électronique à transmission (eau distillée et dichloroéthane) ont été filtrés dans les mêmes conditions.
- Les filtres du distributeur de solvant filtré sont systématiquement changés en cas de début de colmatage.

- Utilisation de gants de manipulation en polyéthylène.

2.2.4. METHODES DE PREPARATION DES ECHANTILLONS PARTICULAIRES POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

En plus de la nécessité de travailler proprement, il convient d'avoir le souci constant que l'échantillon se prête le mieux possible à l'observation, à l'analyse et au comptage. Pour cela, il faut employer des méthodes qui assurent une dispersion régulière et homogène des particules sur le support d'observation afin, en particulier, d'éviter que plusieurs d'entre elles ne se regroupent.

La préparation des échantillons comprend toujours deux phases principales, qu'il s'agisse d'un échantillon destiné à la microscopie à transmission ou à la microscopie à balayage :

- La première étape, commune dans les deux cas, est la récupération d'un pool de particules à partir d'un échantillonnage du produit à étudier.
- La deuxième étape consiste à déposer une partie aliquote, si ce n'est la totalité du pool particulaire, sur le support spécifique à chaque technique de microscopie.

2.2.4.1. Première phase :

Obtention d'un pool particulaire :

Deux méthodes peuvent être envisagées pour récupérer les particules contenues dans un liquide :

- la centrifugation ;
- la filtration.

La centrifugation est un procédé peu utilisé et qui nous a paru occasionner un certain nombre de difficultés :

- Difficulté de concilier un poste de travail propre avec l'utilisation d'une centrifugeuse si celle-ci est de grande taille, ce qui est le cas des appareils performants nécessaires à l'obtention des plus petites particules. De plus, la rotation autour de l'axe peut être une source de particules, ce qui nécessite de bien boucher les récipients de centrifugation.
- Risque de réaliser avec des appareils de performances insuffisantes une ségrégation des particules favorisant la récupération des plus grosses d'entre elles.
- Nécessité de posséder un appareil permettant de centrifuger en une seule fois des volumes importants, ou bien une centrifugeuse en continu.

Pour ces raisons, nous avons préféré choisir la méthode par filtration, déjà décrites de nombreuses fois par les auteurs qui pratiquent l'examen sur membrane au microscope optique.

Les solutés injectables dont nous présentons plus loin l'étude ont été filtrés sur des membranes en esters de cellulose de porosité 0,22 µm et 0,45 um MILLIPORE, de diamètre variable.

Les flacons pour perfusion ont été ouverts en retirant la bague de sertissage, puis le bouchon. Les ampoules ont été ouvertes au chalumeau ou par rupture de la pointe, selon les cas.

Le contenu des ampoules est récupéré à l'aide d'une seringue en plastique, puis filtré à l'aide d'un support SWEENEX, tous deux nettoyés.

Le volume filtré varie de 125 à 250 ml, selon le degré de contamination et le volume nominal du récipient.

2.2.4.2. Préparation des échantillons en vue de la microscopie électronique analytique par transmission (17, 80, 135) :

En microscopie électronique à transmission, le support de l'échantillon est une grille de 3 mm de diamètre et de maille variable. La nature de cette grille est également diverse ; on utilise le plus souvent des grilles en Cuivre, Argent, Palladium et Beryllium.

Le choix de la grille est lié, d'une part, à son prix de revient et, d'autre part, à des considérations techniques relevant de la micro-analyse. En effet, un certain nombre d'électrons frappent les barreaux de cette grille, ce qui produit l'émission de

photons X qui vont être analysés et transcrits sur le spectre en même temps que ceux issus de l'échantillon, créant ainsi une source de confusion. On s'efforcera donc de choisir des grilles de nature telle que les pics des rayons X qu'elles émettent aient peu de chances de chevaucher les différentes raies caractéristiques de l'échantillon.

Nous avons utilisé, pour notre part, des grilles en cuivre BALZERS-UNION de maille 150 et 200, ce qui correspond à des ouvertures respectives de 127 et 85 µm.

Pour que les particules ne passent pas au travers de la grille, il faut "tendre" sur celle-ci un film support de quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur. Les principales qualités de ces films doivent être leur résistance mécanique, leur transparence aux électrons et leur stabilité sous le flux d'électrons.

On utilise le plus souvent comme film support :

- le collodion ;
- le formvar (polyvinyl méthylal) ;
- le carbone ;
- le collodion carboné ;
- le formvar carboné.

Nous avons utilisé dans la plupart des cas le formvar, en raison de sa bonne résistance mécanique et de l'homogénéité du fond obtenu sur les micrographies.

Il s'agit donc de faire parvenir sur cette grille recouverte d'un film support une partie aliquote du pool de particules recueilli sur le filtre. En effet, le filtre, en raison de son épaisseur, étant opaque aux électrons, on ne peut en déposer un fragment sur la grille et l'observer directement.

Or, la quantité de particules couvrant le filtre est très faible, de sorte qu'il est impossible de recueillir celles-ci par grattage de la surface, comme on peut le faire dans certains cas lorsque le filtre est couvert d'une couche de particules très épaisse.

Pour éliminer ce filtre, deux moyens sont envisageables :

- une minéralisation du filtre ;
- une dissolution du filtre.

On constate donc, dès à présent, que dans l'un et l'autre cas on est amené à détruire soit la totalité, soit une partie des particules et fibres organiques qui se trouvent dans le soluté.

2.2.4.2.1. Méthodes par minéralisation :

La minéralisation se fait dans une capsule fermée en Nickel ou en Quartz à 400ºC pendant 4 heures dans un four à moufles. Il faut noter qu'il est préférable, dans la mesure du possible, d'utiliser un four à plasma d'oxygène qui permet une minéralisation à basse température, évitant ainsi tout risque de détérioration de la structure des fibres d'amiante.

Deux possibilités s'offrent alors pour réaliser le transfert de ces cendres sur la grille.

- Première technique :

Inclusion des particules dans le film support par étalement d'une suspension du résidu minéral dans une solution de formvar (203).

MATERIEL :

. Lames de verre.
. Lamelles couvre-objet (24 x 50 mm).
. Une baguette de verre : L ≃ 40-50 mm ; D ≃ 8 mm.
. Un cristallisoir de 50 à 100 ml.
. Un compte-gouttes.
. Un papier filtre dur.
. Grilles de microscopie.

PRODUITS :

. Solution de formvar à 4 mg/ml dans le dichloro-éthane réalisée à partir des produits suivants :
. Dichloro-éthane pur R.P.
. Formvar TOUZART et MATIGNON.

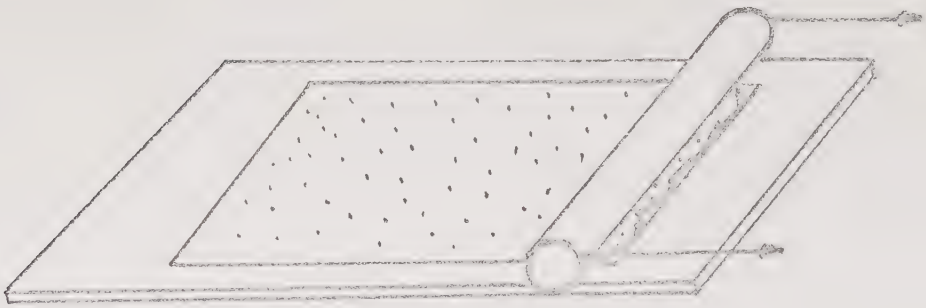
MODE OPERATOIRE :

Les particules sont mises en suspension dans la solution de formvar dans le dichloro-éthane grâce à une agitation aux ultra-sons.

. Appliquer une lamelle couvre-objet sur une lame de verre grâce à quelques gouttes de solution de formvar. La lame sert de support résistant à la lamelle.

. Déposer plusieurs gouttes de la suspension de particules à une extrémité de la lamelle, immédiatement après agitation aux ultra-sons.

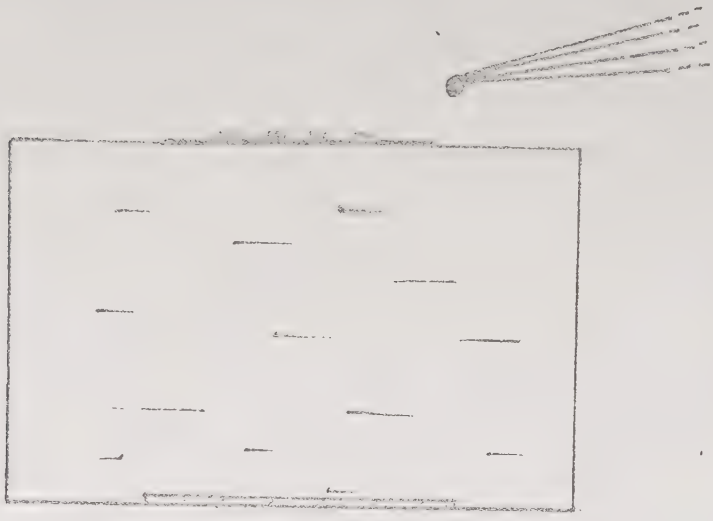
. Etaler les gouttes sur toute la surface de la lamelle par translation de la baguette de verre, sans la faire rouler et en appliquant une pression modérée.



. Séparer la lamelle de la lame et laisser sécher 30 secondes.

. Décoller le film en enfonçant la lamelle selon un angle de 45º environ dans un cristallisoir plein à ras bord d'eau distillée filtrée.

. Le film dans lequel sont incluses les particules flotte à la surface de l'eau. Déposer les grilles de façon régulière afin qu'elles soient représentatives de la répartition des particules dans l'ensemble du film.



. Récupérer l'ensemble film + grilles en le faisant adhérer sur un papier filtre rectangulaire légèrement plus grand que le film.

. Placer le papier filtre supportant les grilles et le film dans une boîte de Pétri et laisser sécher.

Avant utilisation, on vérifie l'homogénéité de répartition des particules sur les diverses grilles au microscope optique.

- Deuxième technique :

Le résidu de poussières minérales est repris par 2 ml d'eau distillée filtrée, puis mis en suspension par agitation aux ultra-sons.

On prélève en cours d'agitation, avec une micropipette de type PIPETMAN, 5 µl de cette suspension qui sont déposés à la surface de chaque grille couverte de formvar. Nous préparons en général 5 grilles.

2.2.4.2.2. Méthodes par dissolution :

Ces méthodes de transfert des particules du filtre sur la grille de microscopie sont praticables avec un certain nombre de variantes (173, 112).

Le principe est toujours le même, il convient de :

- déposer sur la grille recouverte d'un film un fragment de filtre ;
- dissoudre ce morceau de filtre avec un solvant adapté afin que les particules se déposent sur le film support et que le filtre soit éliminé.

Nous présenterons ici deux variantes à cette méthode.

- Méthode directe :

Dans une boîte de Pétri, on place un support poreux en verre fritté.

Une grille recouverte d'un film support est déposée sur le verre fritté. Un morceau du filtre, de taille équivalente à la grille, est déposé, la face supportant les particules tournée vers le bas.

On remplit la boîte de Pétri d'un solvant du filtre et on la laisse ainsi formée pendant 24 heures. Le niveau du solvant ne doit pas dépasser le support poreux afin que la grille et le filtre ne soient mouillés que par capillarité.

Il est préférable d'utiliser des films supports en carbone, car les films plastiques risquent, d'une part, d'être partiellement dissous par le solvant et constituent, d'autre part, un obstacle à la progression du solvant vers le filtre.

Selon le type de filtre utilisé, les solvants peuvent être l'acétone, le chloroforme ou l'éther monométhylique de l'éthylène glycol.

- Méthode à double couche de carbone :
Méthode "Sandwich" :

Préalablement à la filtration du soluté, on recouvre le filtre d'une couche de carbone dans un évaporateur sous vide EDWARDS.

Après filtration du soluté et séchage du filtre, on évapore une nouvelle couche de carbone, de sorte que les particules sont prises entre les deux couches de carbone.

Un morceau de filtre est transféré sur une grille non couverte d'un film support et déposée comme précédemment sur le support poreux au fond d'une boîte de Pétri. La face du filtre couverte des deux couches de carbone est orientée vers le haut.

On laisse en contact comme précédemment avec un solvant du filtre.

Dans l'une et l'autre de ces méthodes, on doit découper à la surface du filtre des morceaux de 3 mm de côté, répartis de telle façon qu'ils soient représentatifs du filtre. Par exemple, ils peuvent être régulièrement espacés sur un diamètre du filtre.

Nous avons essayé, sur la fin de notre travail, des filtres NUCLEPORE en polycarbonate qui, en raison de leur faible épaisseur, sont plus faciles à dissoudre.

2.3. METHODOLOGIE D'INVESTIGATION DES ECHANTILLONS -

Nous avons déjà indiqué les raisons pour lesquelles notre travail a porté essentiellement sur une étude qualitative des particules. Il nous paraît cependant nécessaire de préciser que si l'on désire réaliser un comptage des particules en microscopie électronique, il est préférable, selon nous, d'utiliser la microscopie à balayage qui, d'une part, permet d'étudier une surface d'échantillon plus importante et, d'autre part, fait appel à une préparation des échantillons beaucoup plus simple. En effet, certaines des

méthodes de préparation des échantillons pour la microscopie à transmission peuvent être sources d'erreur en raison des manipulations intermédiaires auxquelles elles font appel.

LES PHASES DE L'ANALYSE QUALITATIVE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ANALYTIQUE PAR TRANSMISSION.

On recherche par cette méthode à obtenir pour chaque particule soumise à l'investigation deux documents :

- une micro-photographie de la particule ;
- une photographie de son spectre d'émission X.

Ces deux documents nous fournissent trois types d'information :

- la taille de la particule ;
- la forme et l'aspect de la particule ;
- la constitution chimique élémentaire de la particule.

En fonction de ces trois données, nous définissons ensuite, après analyse de 100 particules, des familles de particules. Pour chaque famille, un tableau de résultats permet d'indiquer :

- la nature chimique élémentaire ;
- la forme et l'aspect des particules ;
- la répartition granulométrique des particules ;
- le nombre de particules classées dans cette famille.

D'un point de vue plus pratique, la manipulation se réalise de la façon suivante :

- Nous observons 4 grilles par échantillon, à raison de 5 carreaux par grille espacés régulièrement sur un diamètre de la grille, ceci jusqu'à concurrence de 100 particules, sans dépasser 5 particules par carreau.
- Si l'on trouve moins de 5 particules par carreau, on observe des carreaux supplémentaires jusqu'à concurrence des 100 particules.

Pour chaque particule sélectionnée, les opérations suivantes sont réalisées :

- Prise d'une micrographie de la particule sous une tension d'accélération de 80 kV.
- Enregistrement du spectre d'émission de rayons X de cette même particule.

Pour cela, on réalise les opérations suivantes :

• SUR LE MICROSCOPE :

- Inclinaison de la platine goniométrique à 40º afin de diriger les rayons X émis vers le détecteur.
- Centrage de la particule au milieu de l'écran fluorescent du microscope.
- Focalisation du faisceau d'électrons sur la particule à l'aide des deux condenseurs et des stigmateurs.

Planche n° 4

Photographie n° 1 : Tableau frontal de la console de l'analyseur multicanaux E.D.A.X. et écran vidéo.

1 : affichage des données

2 : sélection des fenêtres

3 : programmation de la durée d'analyse

4 : choix des mémoires

5 : choix des gammes d'énergie

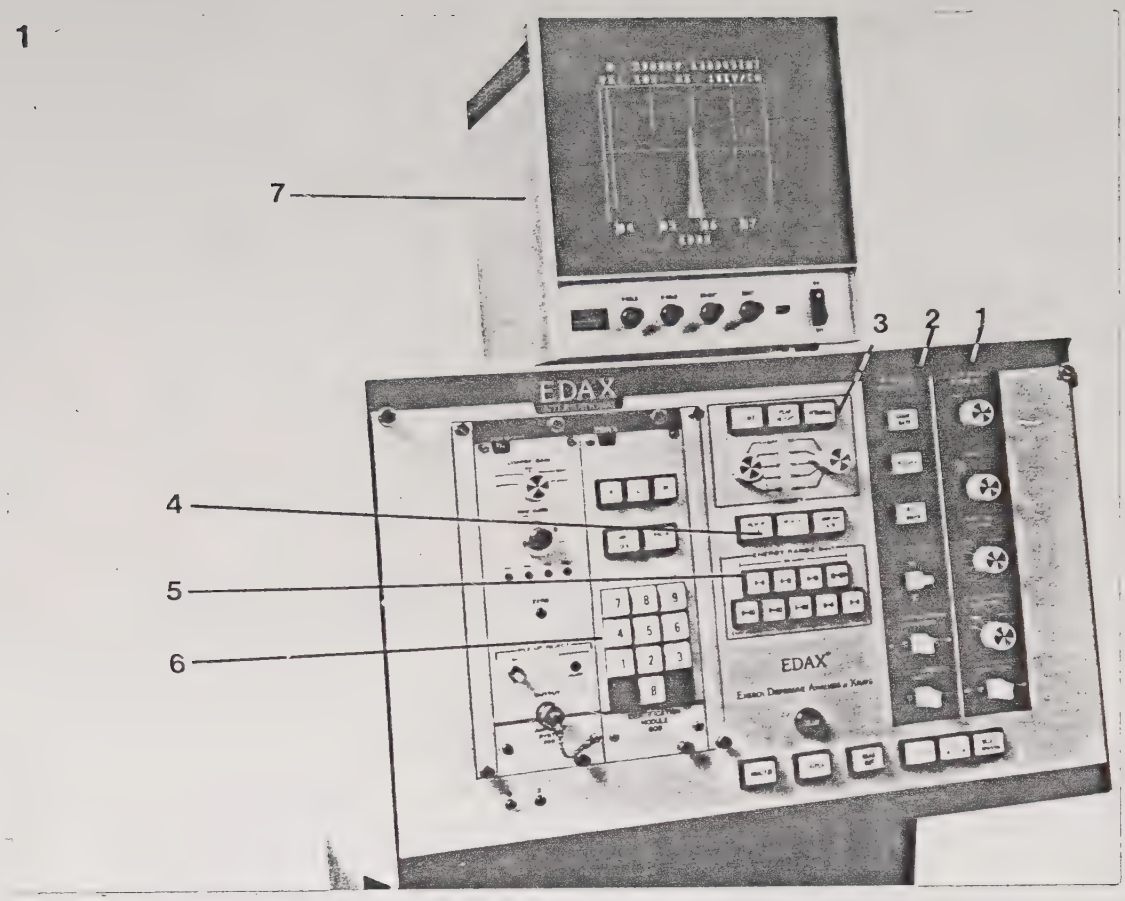
6 : identification des pics

7 : écran vidéo

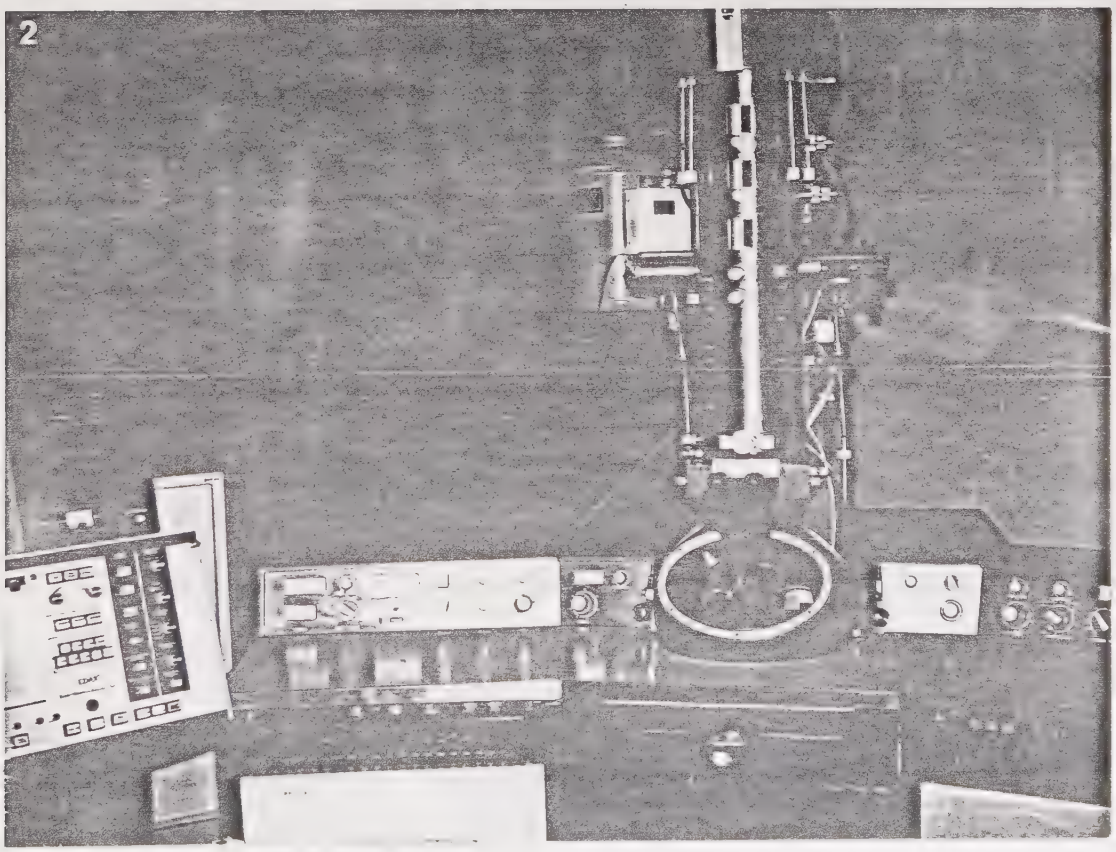
Photographie n° 2 : Microscope électronique Philips EM 300 couplé au système d'analyse des rayons X en énergie EDAX.

Le détecteur de rayons X est à mi-hauteur de la colonne, sur la gauche.

1



2



- Enlever le diaphragme de l'objectif pour éviter qu'il n'émette des rayons X à proximité de l'échantillon et du détecteur.

- Réglage de la tension d'accélération à 60 kV, ou même à 40 kV en cas de trop grande fragilité du film support.

o SUR L'ANALYSEUR MULTICANAUX :

- Phase d'enregistrement du spectre :

. Effacer le contenu des mémoires.

. Choisir la gamme d'énergie : 0-40 keV à 100 eV/canal. C'est la gamme la plus large qu'il convient d'utiliser lorsque la nature de l'échantillon est à priori inconnue.

. Après mise en route de l'analyse, vérifier que le rapport entre le nombre de photons qui pénètrent dans le détecteur et le nombre de photons analysés est, tous deux affichés en alpha-numérique sur l'écran vidéo, de l'ordre de 1,2.

. Arrêter manuellement l'analyse au bout d'environ une minute lorsque les pics sont bien différenciés.

- Phase d'identification des pics :

Un curseur lumineux mobile le long de l'échelle d'énergie du spectre permet d'identifier les pics du spectre. Lorsque ce curseur est positionné sur le centre d'un pic, on lit en alpha-numérique de l'écran vidéo le numéro atomique et le symbole de l'élément correspondant.

On identifie, dans un premier temps, les raies K, ensuite les raies L, puis les raies M.

Une attention particulière doit être apportée lorsqu'un élément possède une raie K située au voisinage de la raie L ou M d'un autre élément.

Une photographie du spectre est ensuite prise à l'aide d'un boîtier photographique muni d'un film KODAK TRI-X PAN.

Pratiquement, on utilise :

les raies K pour $11 < Z < 42$, soit du Na ou Mo
" " L " $30 < Z < 92$, soit du Zn à U
" " M " $62 < Z < 92$, soit du Zn à U

Les principaux éléments que nous avons rencontrés au cours de nos analyses sont identifiables par les raies spectrales suivantes :

Sodium.....	$K\alpha$ =	1,04 keV		
Magnésium..	$K\alpha$ =	1,25 "		
Aluminium..	$K\alpha$ =	1,49 "		
Silicium...	$K\alpha$ =	1,74 "		
Phosphore..	$K\alpha$ =	2,00 "		
Soufre.....	$K\alpha$ =	2,30 "		
Chlore.....	$K\alpha$ =	2,60 "		
Potassium..	$K\alpha$ =	3,30 "		
Calcium....	$K\alpha$ =	3,69 keV	$K\beta$ =	4,01 keV
Titane.....	$K\alpha$ =	4,50 "	$K\beta$ =	4,90 "
Chrome.....	$K\alpha$ =	5,40 "	$K\beta$ =	5,90 "
Manganèse..	$K\alpha$ =	5,90 "	$K\beta$ =	6,50 "
Fer.....	$K\alpha$ =	6,40 "	$K\beta$ =	7,05 "
Cuivre.....	$K\alpha$ =	8,04 "	$K\beta$ =	8,90 "
Zinc.....	$K\alpha$ =	8,60 "	$K\beta$ =	9,60 "

Baryum. $K\alpha$ = 32,06 keV $K\beta$ = 36,50 keV

$L\alpha$ = 4,50 keV, $L_{\beta 1}$ = 4,80 keV, $L_{\beta 2}$ = 5,10 keV

Plomb.. $L\alpha$ = 10,50 keV, $L_{\beta 1}$ = 12,6& keV, $L_{\beta 2}$ = 12,62 keV

$L\gamma$ = 14,7 keV, M = 2,4 keV

- N.B. : Dans les documents que nous présentons, le Cuivre des grilles et le Chrome de la Colonne du microscope sont à l'origine de pics parasites correspondant aux raies $K\alpha$ et $K\beta$ de ces deux éléments.

3. APPLICATIONS A DIVERS CAS DE CONTAMINATION

Nous avons été amené, au cours de ce travail, à examiner divers échantillons qui nous ont été confiés :

- solutés injectables du commerce, pour lesquels nous avons réalisé une étude qualitative de la contamination particulaire, ainsi qu'une recherche de la présence éventuelle d'amiante ;
- talcs et poudres de toilette à base de talc, dans lesquels nous avons recherché des fibres d'amiante.

Avant de présenter successivement les résultats de ces analyses, il convient de réaliser quelques témoins de divers types de particules que l'on peut trouver dans ces échantillons, et en particulier des principaux types d'amiante.

3.1. L'AMIANTE -

Nous nous sommes procuré les échantillons-types d'amiante de l'U.I.C.C. auprès du Docteur TIMBRELL(*) que nous remercions.

En effet, à la suite des recommandations faites en 1964 par le groupe de travail "Amiante et Cancer" de l'Union Internationale Contre le Cancer, les échantillons

(*)Medical Research Council, Pneumoconiosis Unit, Landough Hospital, Penarth, Glamorgan (Great Britain).

étalons des cinq principaux types d'amiante ont été préparés par des chercheurs d'Afrique du Sud et du Royaume-Uni, avec l'aide des entreprises minières intéressées de divers pays (254, 255).

Ces cinq types d'amiante sont :

- le Chrysotile Canadien "B" ;
- le Chrysotile Rhodésien "A" ;
- l'Amosite d'Afrique du Sud ;
- le Crocidolite d'Afrique du Sud ;
- l'Anthophyllite.

Nous avons réalisé des photographies témoins des spectres d'émission X de ces divers types d'amiante ainsi que des micrographies à différents grossissements, que nous présentons sur les planches suivantes.

On peut faire appartenir les amiantes à deux grands groupes, en fonction de leur structure cristalline (245) :

- les serpentines, parmi lesquelles on trouve le chrysotile qui est le type d'amiante le plus employé, et principalement dans les filtres ;
- les amphiboles, de moindre importance sur le plan commercial, qui regroupent les autres types d'amiante.

Dans tous les cas, il s'agit de silicates naturels fibreux, hydratés, dont la couleur dépend de la composition chimique et en particulier de la teneur en ions magnésium, fer et sodium.

• LE CHRYSOTILE (A et B) :

Structure chimique : $Mg_6\ Si_4\ O_{10}\ (OH)_8 + Fe$

Il s'agit de fibres de longueur variable, pouvant atteindre 200 µm et plus, et de diamètre variable. Ces fibres sont souvent incurvées, elles sont constituées d'un amas de fibrilles innombrables.

Chaque fibrille a une longueur variable, mais est caractérisée par un diamètre à peu près constant de 30 à 40 nm (38).

Ces fibrilles ont l'aspect d'un cylindre creux, le diamètre du canalicule central étant de 5 à 10 nm.

Cet aspect est très caractéristique et permet leur identification en microscopie électronique à transmission.

En microscopie à balayage, l'identification est moins aisée car on n'observe pas le canalicule central de la fibrille puisque cet appareil ne donne que des renseignements topographiques.

Le spectre d'émission X montre trois éléments (raies K) :

- Un pic Kα de Magnésium important.
- Un pic Kα de Silicium important.
- Un pic Kα de Fer de faible importance.

Le rapport de la hauteur des pics $\frac{Si}{Mg}$ est légèrement supérieur à 1 en règle générale.

PLANCHE n° 5

Chrysotile Rhodésien A

1) Fibres incurvées : 5200 X

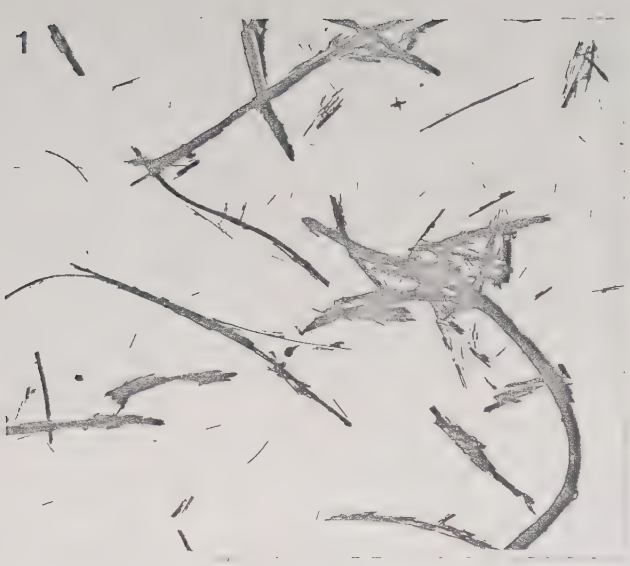
2) Spectre d'émission X

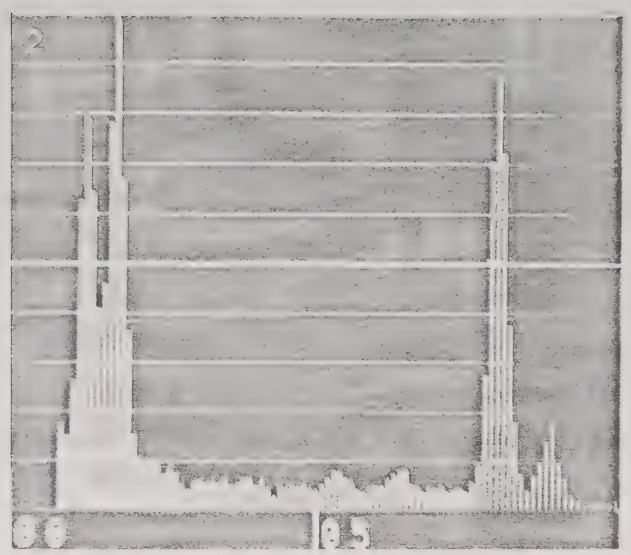
3) Amas de fibres enchevêtrées : 10.000 X

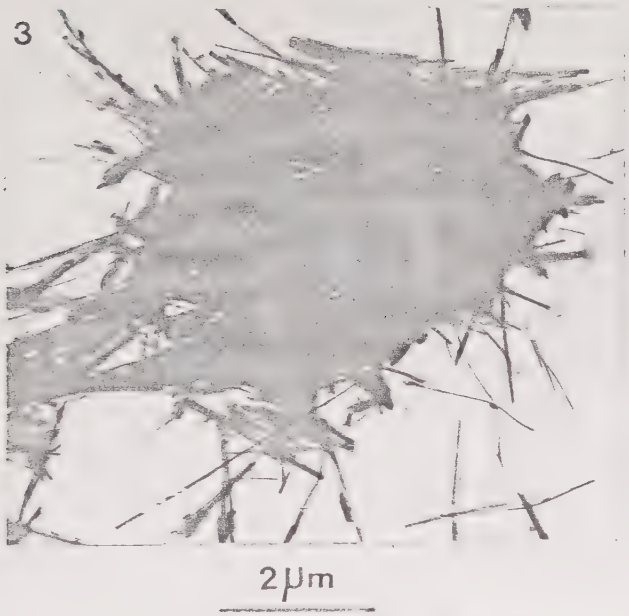
4) Amas de fibrilles constituant une fibre: 28.000 X

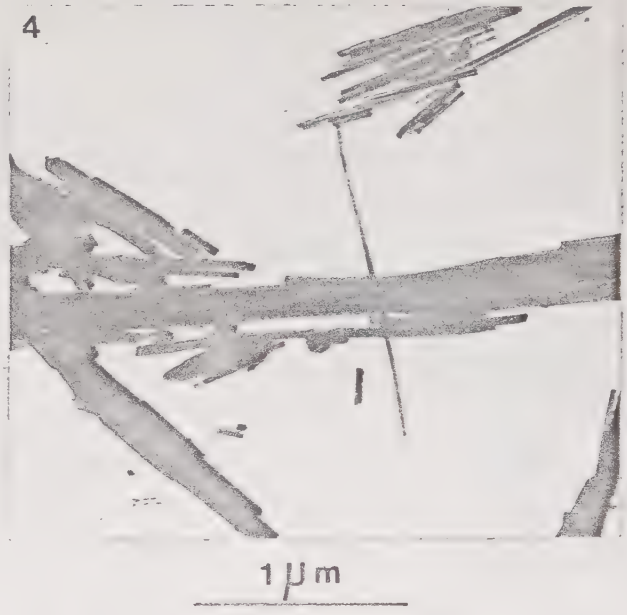
5) Fibrilles : 45.000 X

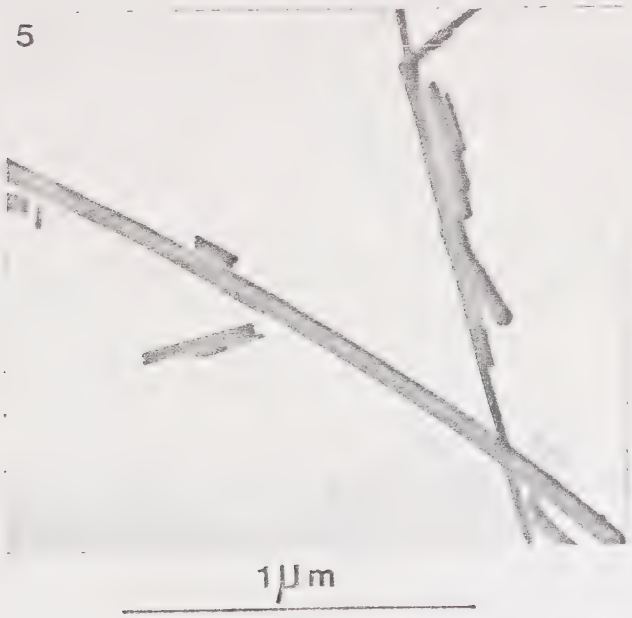
6) Fibrilles : on observe le canalicule central; 58.00


1
5μm


2
Mg Si
Fe


3
2μm


4
1μm


5
1μm

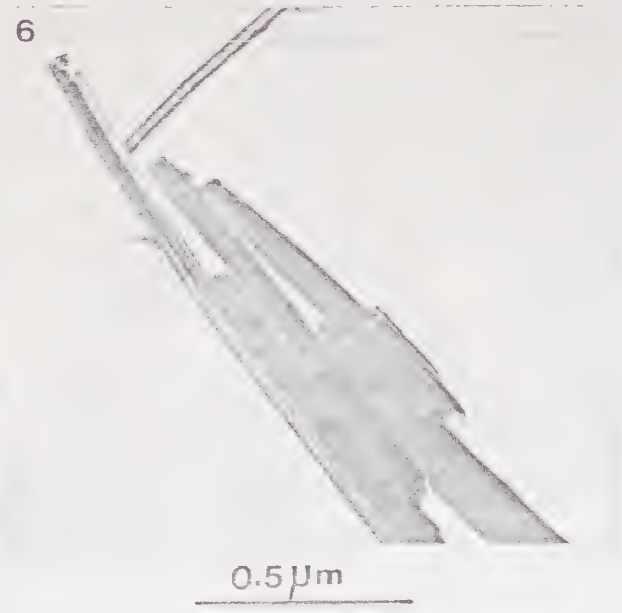

6
0.5μm

PLANCHE n° 6

Chrysotile Canadien B

1) Fibres incurvées : 1.700 X

2) Spectre d'émission X identique à celui du chrysotile Rhodésien A

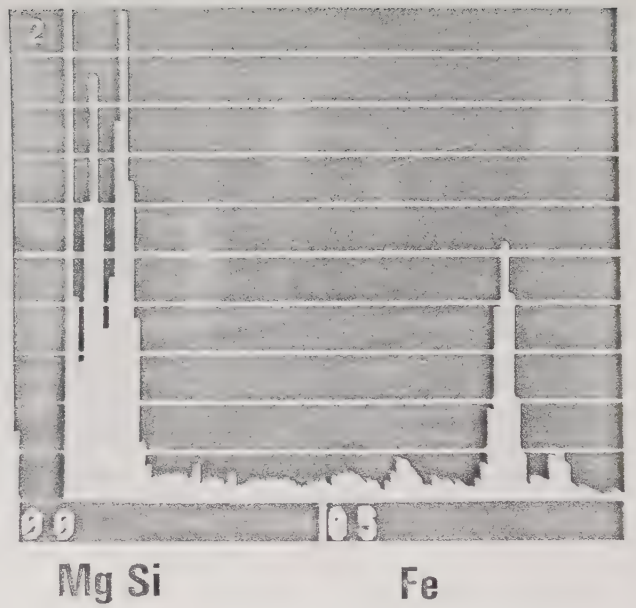
3) Fibrilles en paquets : 17.000 X

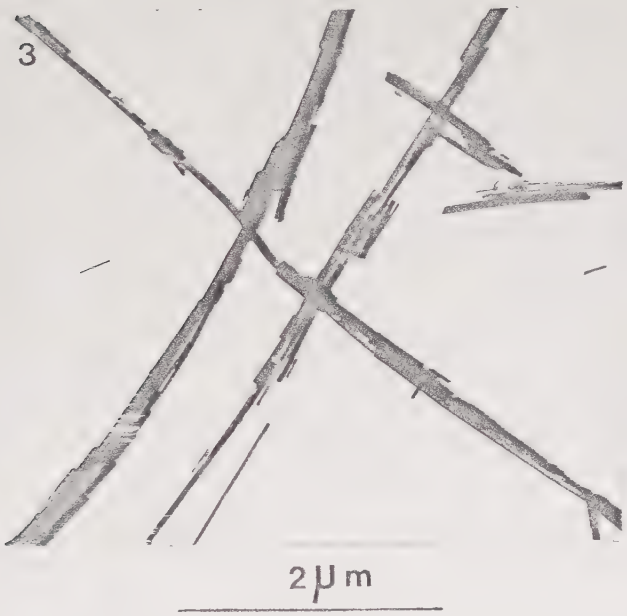
4) Fibrilles : 45.000 X

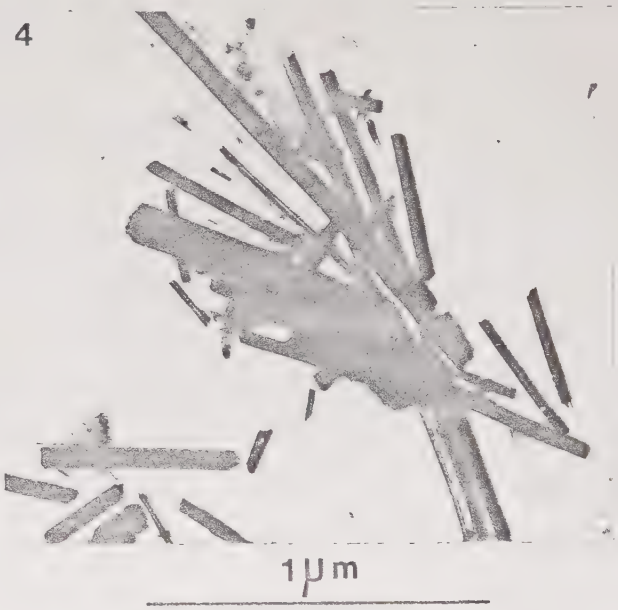
5) Fibrilles : 28.000 X

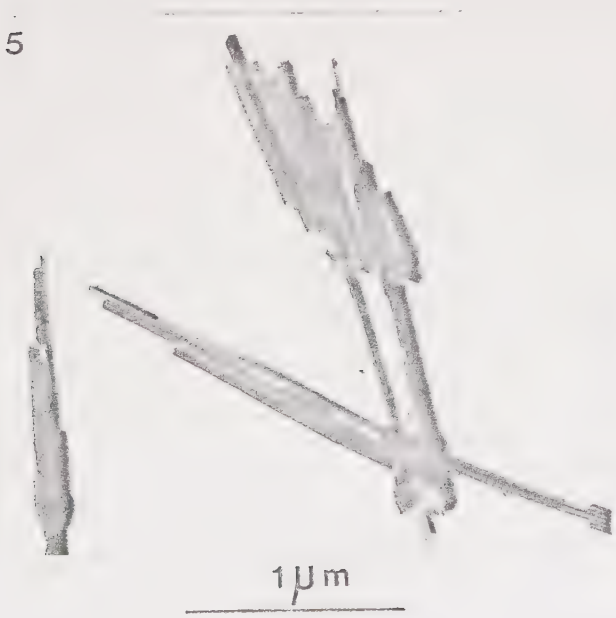
6) Fibrilles isolées : 70.000 X

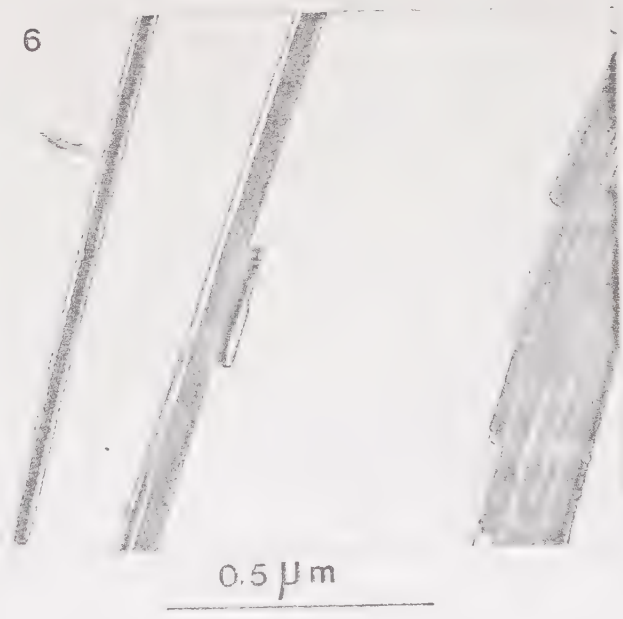
1
20μm


2
0.0
0.5
Mg Si
Fe


3
2μm


4
1μm


5
1μm


6
0.5μm

• L'ANTHOPHYLLITE :

Structure chimique : $Mg_7\ Si_8\ O_{22}\ (OH)_2 + Fe$

Comme toutes les amphiboles, il s'agit de fibres compactes. Ces fibres sont droites et opaques au microscope électronique à transmission.

Le spectre d'émission X présente trois éléments (raies K) :

- Un pic Kα de Magnésium.
- Un pic Kα de Silicium

Le rapport $\frac{Si}{Mg}$ est égal à 2 environ.

- Un pic K de Fer de faible intensité.

• L'AMOSITE :

Structure chimique : $Fe_7\ Si_8\ O_{22}\ (OH)_2 + Mg$

Fibres compactes, droites, opaques au microscope à transmission.

Le spectre d'émission X présente trois éléments (raies K) :

- Un pic Kα de Magnésium de faible intensité.
- Un pic Kα de Silicium de forte intensité.
- Un pic Kα de Fer, plus intense que le pic de Silicium, accompagné d'un pic Kβ.

PLANCHE n° 7

CROCIDOLITE

1) Fibres : 1.700 X

2) Spectre d'émission X. Le Sodium est caché par l'épaulement du pic de Magnésium.

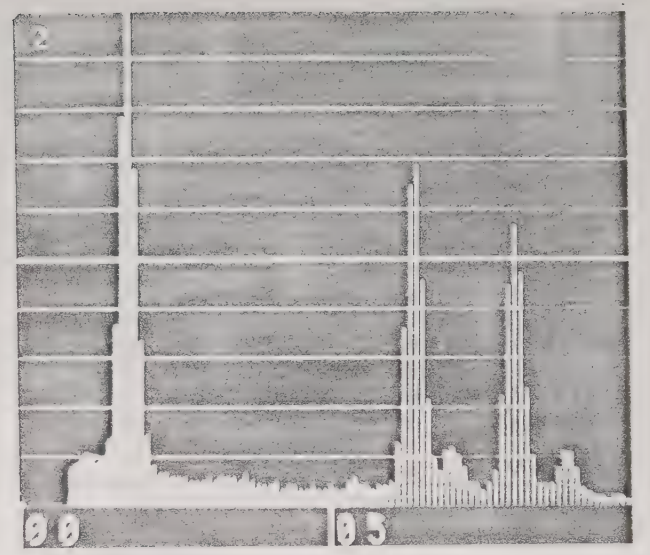
3) Fibres de tailles variées : 5.200 X

4) Longues fibres d'aspect translucide au microscope électronique : 17.000 X.

5) Petites fibres translucides : 28.000 X

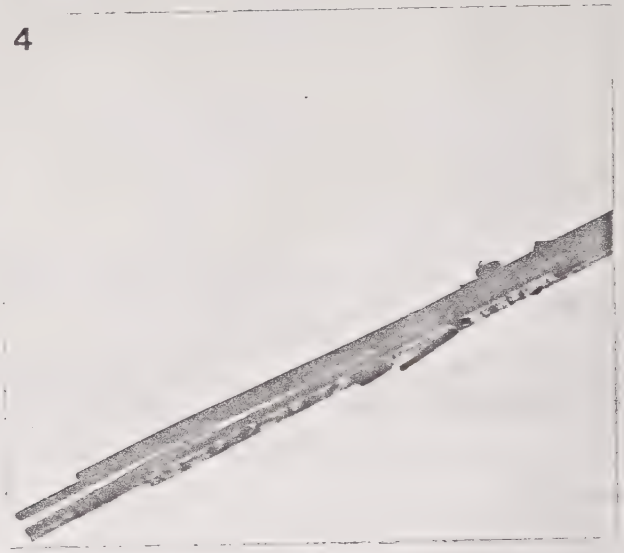
6) Fibres à fort grossissement : 45.000 X

20 μm

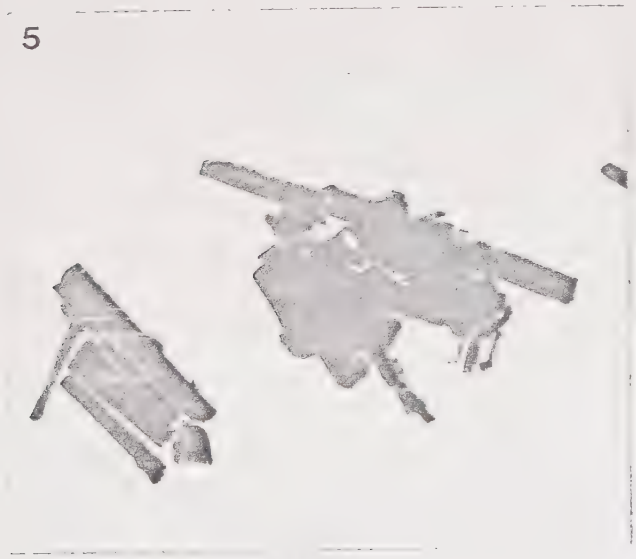


Mg Si Fe

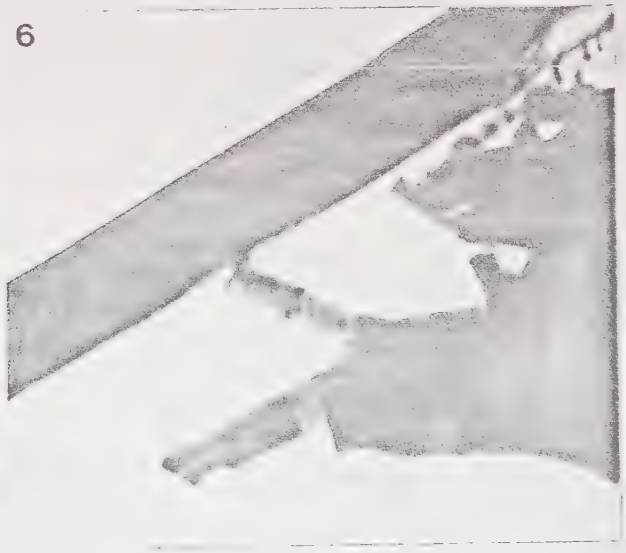
5 μm



2 μm



1 μm



1 μm

PLANCHE n° 8

AMOSITE

1) Fibres : 1.700 X

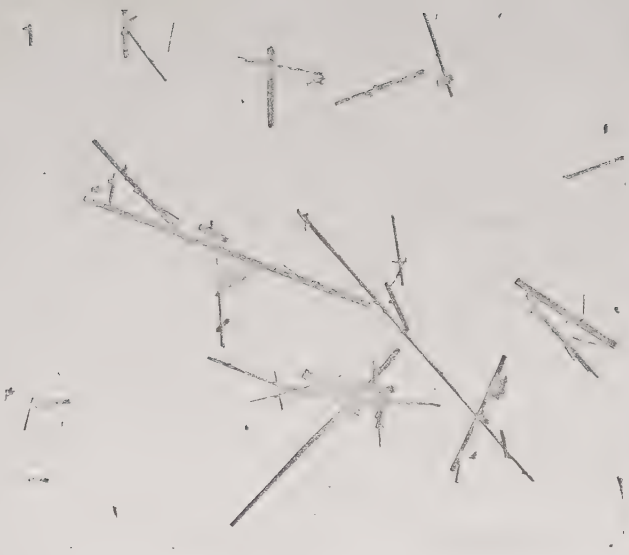
2) Spectre d'émission X

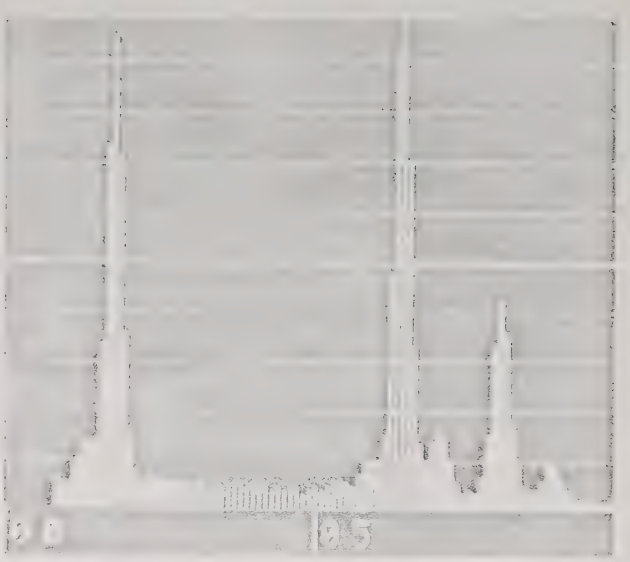
3) Fibres : 1.700 X

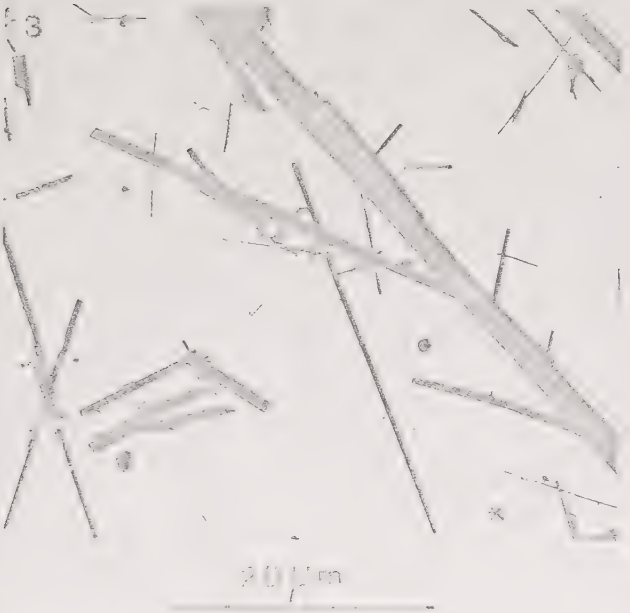
4) Fibres : 5.200 X

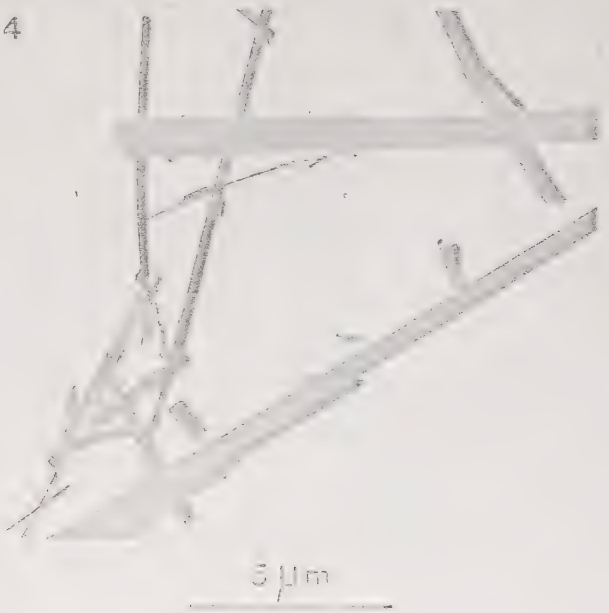
5) Fibres : 5.200 X

6) Petite fibre : 17.000 X


1
20 µm


Mg Si
Fe


3
20 µm


4
5 µm

5
2 µm

6
1 µm

PLANCHE n° 9

ANTHOPHYLLITE

1) Fibres: 1.700 X

2) Spectre d'émission X

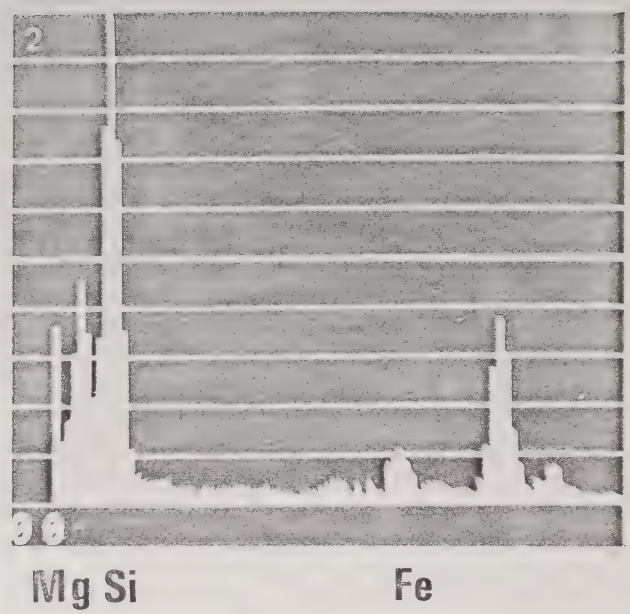
3) Longue fibre: 2.200 X

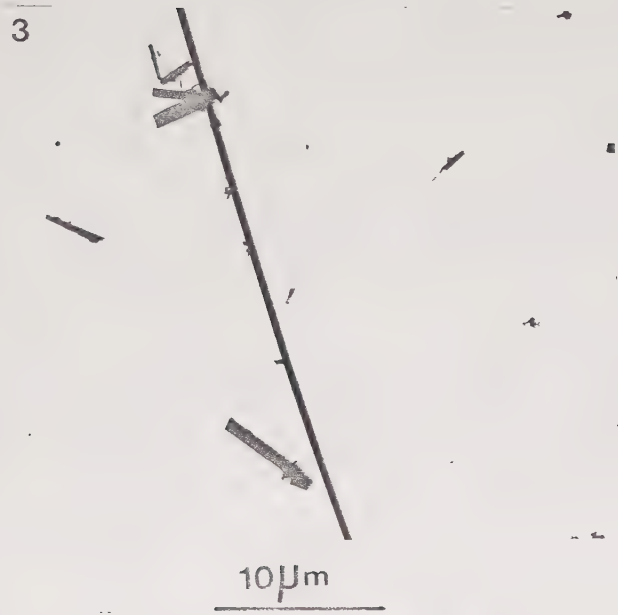
4) Fibre: 17.000 X

5) Fibres: 5.200 X

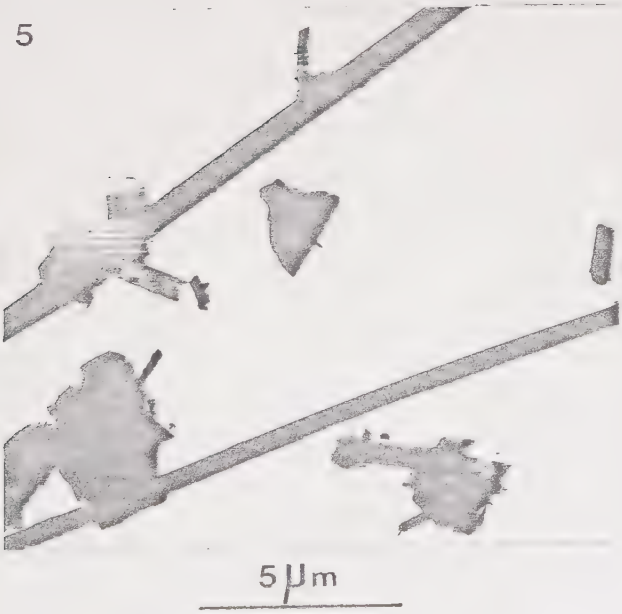
6) Fibre: 28.000 X

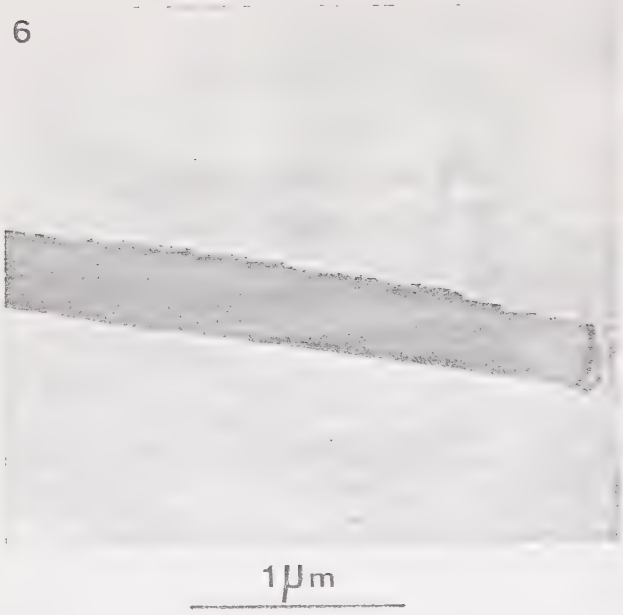
1
20μm


2
Mg Si
Fe


3
10μm

4
2μm


5
5μm


6
1μm

• LE CROCIDOLITE :

Structure chimique :

$Na_2 Fe_2^{+++} Fe_3^{++} Si_8 O_{22} (OH)_2 + Mg + Ca$

Fibres droites, translucides au microscope électronique à transmission.

Le spectre d'émission X présente quatre éléments (raies K) :

- Un grand pic Kα de Silicium.
- Un pic de Fer Kα un peu plus petit, accompagné d'un pic Kβ.
- Un pic Kα de Magnésium de faible intensité.
- Un pic Kα de Sodium à peine visible.

3.2. ETUDE QUALITATIVE DES CONTAMINANTS PARTICULAIRES DANS DIVERS SOLUTES INJECTABLES DU COMMERCE -

3.2.1. NATURE ET ORIGINE DES ECHANTILLONS ETUDIES.

Nous avons étudié des solutés injectables aqueux présentés dans des contenants en verre. Certains de ces échantillons, très contaminés, étaient constitués de récipients rejetés par le fabricant lors du contrôle optique systématique par mirage ; l'étude des contaminants a été alors faite afin d'élucider leur nature et leur origine. D'autres échantillons, beaucoup moins contaminés, étaient commercialisés.

- Echantillon Nº 1 :

Soluté injectable isotonique de carbonate monosodique à 1,4 % en flacons pour perfusion de 250 ml. La contamination particulaire était très visible à l'oeil nu, ce lot ayant été rejeté après contrôle par mirage.

- Echantillon Nº 2 :

Soluté injectable isotonique de chlorure de sodium à 9 o/oo en flacons pour perfusion de 500 ml. Comme précédemment, la contamination était très importante et les flacons avaient été rejetés après contrôle par mirage.

- Echantillon Nº 3 :

Soluté injectable à nom déposé, présenté en ampoules bouteilles de 5 ml. Le soluté a un pH de 3,5 ; les ampoules examinées proviennent toutes de préparations commercialisées. Deux lots ont été étudiés, fabriqués sur deux chaînes différentes ; le premier donne un fort pourcentage de rejet au contrôle par mirage, le second un pourcentage faible.

- Echantillon Nº 4 :

Soluté injectable à nom déposé, présenté en ampoules bouteilles de 2,5 ml. Le soluté a un pH acide ; le lot étudié n'a pas pu être commercialisé à la suite d'une contamination brutale et massive survenue après la mise en ampoules.

- Echantillon Nº 5 :

Soluté injectable à nom déposé, présenté en ampoules bouteilles de 5 ml. Ce lot n'a été étudié que pour rechercher la présence éventuelle d'amiante, à la demande du fabricant.

3.2.2. RESULTATS.

Famille	N/100(*)	Composition	Taille	Aspect
- Echantillon Nº 1 :				
A	88	Verre	2 à 20 µm	denses, compactes, arêtes saillantes
B	12	Fe	L = 10 à 12 µm l = 2 à 4 µm	allongées, densité moyenne, contours irréguliers
- Echantillon Nº 2 :				
A	54	Verre	2 à 20 µm	denses, compactes, arêtes saillantes, contours réguliers
G	16	Si Al, K, Mg, S	5 à 6 µm	densité moyenne, contours irréguliers
B	16	Fe	2 à 8 µm	denses, contours très irréguliers
D	14	Cu	4 à 6 µm	aiguilles en étoiles

(*) N/100 = fréquence pour 100 particules.

Famille	N/100	Compo-sition	Taille	Aspect
- Echantillon Nº 3, lot Nº 1 :				
A	28	Verre	2 à 30 µm	denses, compactes, anguleuses
C	29	Cr	1 à 5 µm	variable, plutôt irrégulier
E	17	Fe, Cr	3 à 5 µm	contours irréguliers
G	14	Si Fe, Cr	15 à 25 µm	faible densité, contours irréguliers
F	6	Na, Cl, K	5 à 7 µm	cristaux
H	6	divers	divers	divers
- Echantillon Nº 3, lot Nº 2 :				
A	34	Verre	5 à 30 µm	compactes, denses, arêtes saillantes
C	33	Cr	2 à 80 µm	compactes, contours tourmentés
G	8	Si K, Cl, S, Mg, Ca, Fe	1 à 5 µm	peu compactes, peu régulières
E	5	Fe, Cr	5 à 15 µm	peu régulières
F	5	Na, Cl, K	5 à 11 µm	cristaux
B	11	Fe	5 à 15 µm	contours irréguliers
H	4	divers	divers	divers

PLANCHE n°10

Echantillon n° 1 :

Soluté injectable de carbonate monosodique à 1,4 %

Particules de verre (famille A)
accompagnées de leur spectre d'émission X

1) 10.000 X

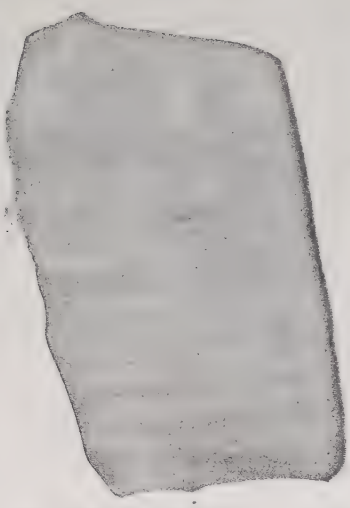
3) 8.000 X

4) 8.000 X

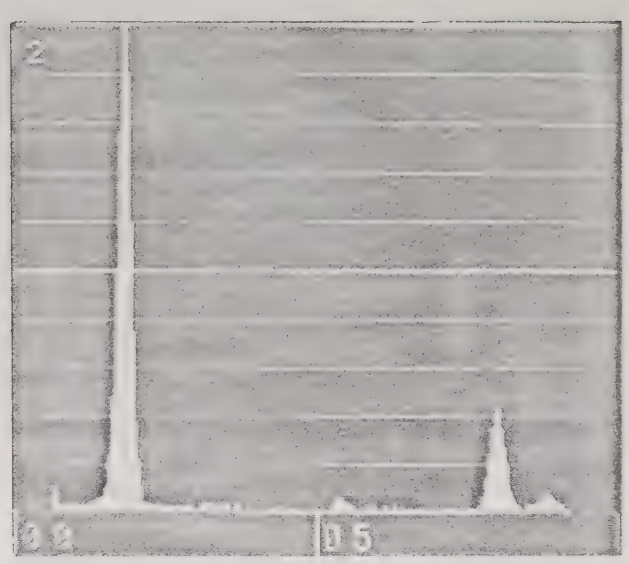
5) 8.000 X

6) 8.000 X

1



2 μm

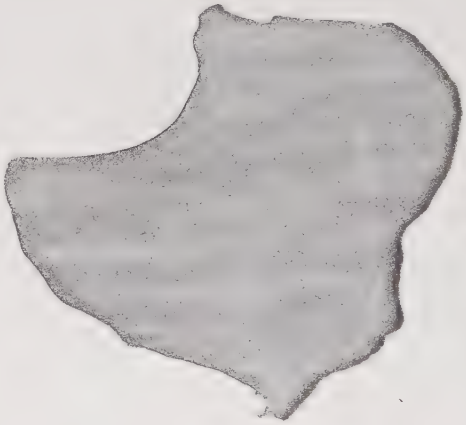


Si

3

5 μm

4

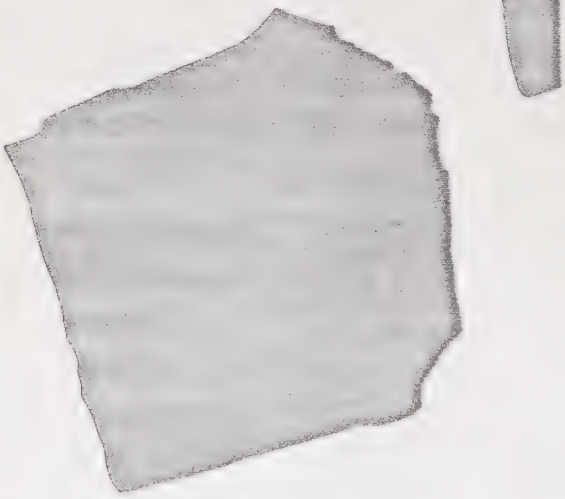


5 μm

5

5 μm

6



5 μm

PLANCHE n° 11

Echantillon n° 1 :

Soluté injectable de carbonate monosodique à 1,4 %

1)et 2) particule de verre accompagnée de son spectr d'émission X

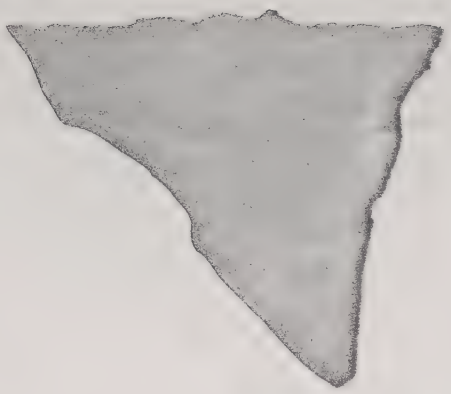
10.000 X

3) à 6) : particules de Fer (famille B)

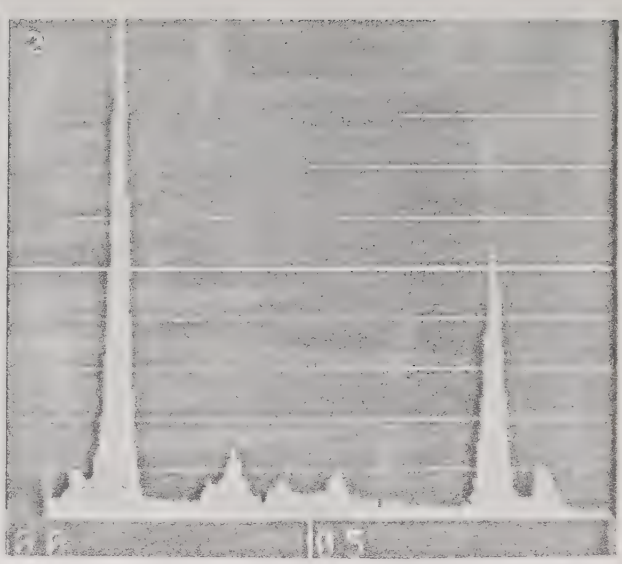
accompagnées de leur spectre d'émission X

8.000 X

1



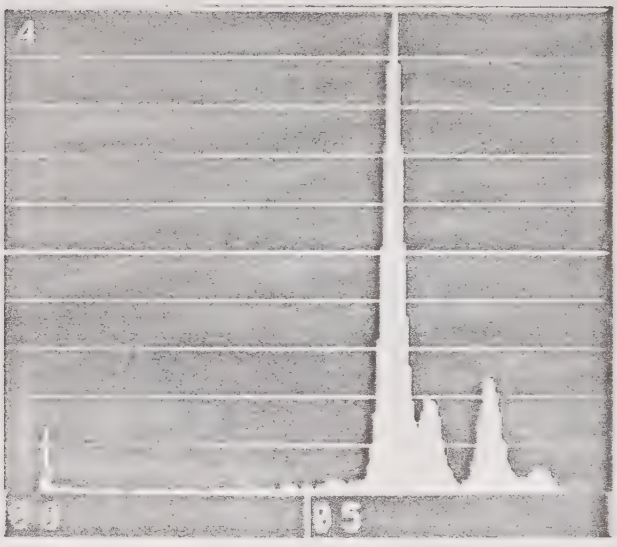
2 μm



Na Si K Ca Ti

3

5 μm



Fe

5

5 μm

6

5 μm

PLANCHE n° 12

Echantillon n° 2

Soluté injectable de chlorure de sodium à 9 ‰

Particules de verre accompagnées de leur spectre d'émission X.

1) 8.000 X

3) 2.600 X

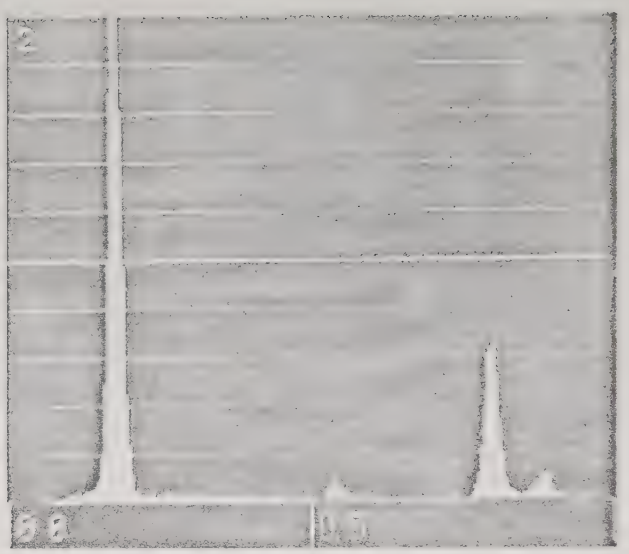
4) 8.000 X

5) 8.000 X

6) 8.000 X

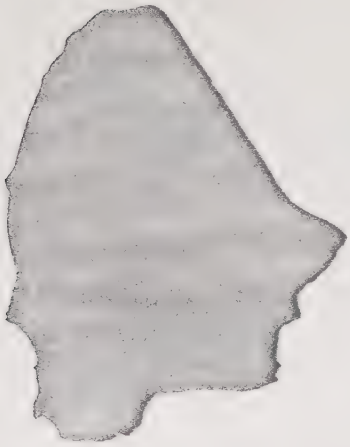
1

5μm



Si

3



5μm

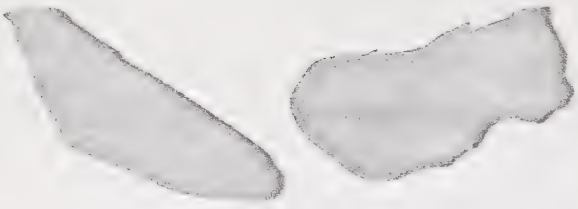
4

5μm

5

5μm

6



5μm

PLANCHE n° 13

Echantillon n° 2

Soluté injectable de chlorure de sodium à 9 ‰

1) La grosse particule est une particule de verre accompagnée de son spectre d'émission X (2)

La petite particule est une particule de Fer (famille B) comme les particules de la photographie (3) accompagnées de leur spectre (4)

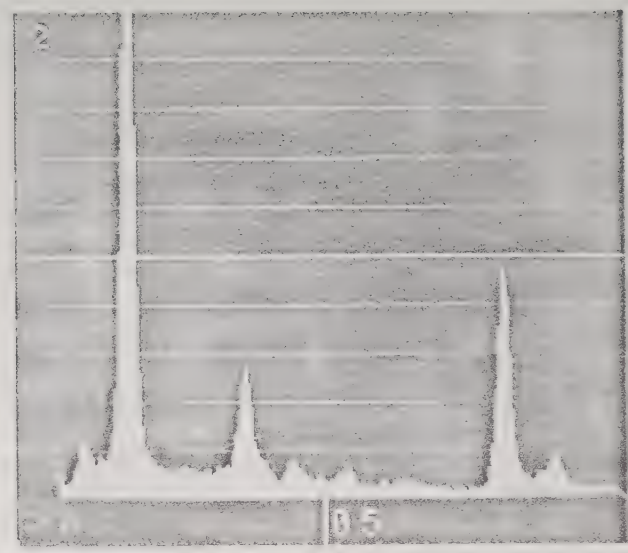
5.200 X

5) et 6) Particules de cuivre (famille D) accompagnées de leur spectre d'émission X (raies L, Kα et Kβ)

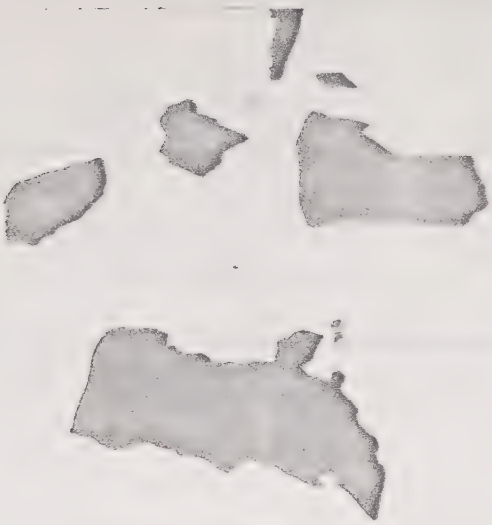
5.200 X

1

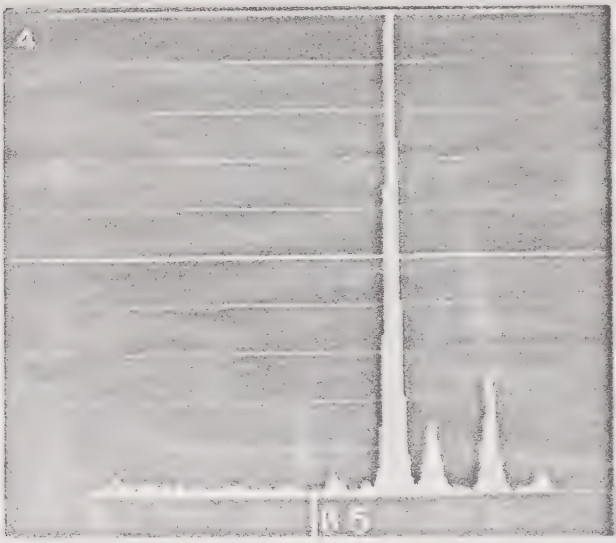
5 μm



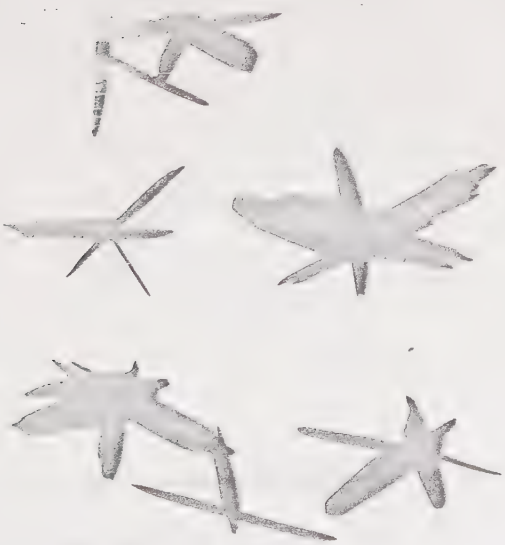
3



5 μm



5



5 μm

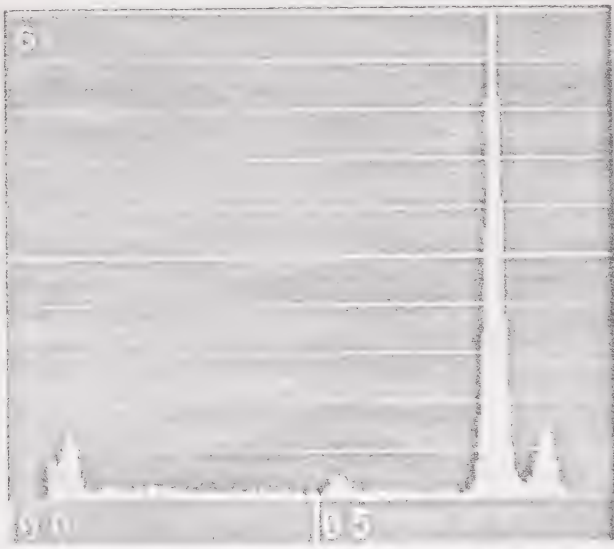


PLANCHE n° 14

Echantillon n° 3 - lot 1
Soluté injectable du commerce

1) Particule de verre : 8.000 X

2) Spectre d'émission X de particules de verre

3) Particule de verre:2.600 X

4) Particule de verre : 5.200 X

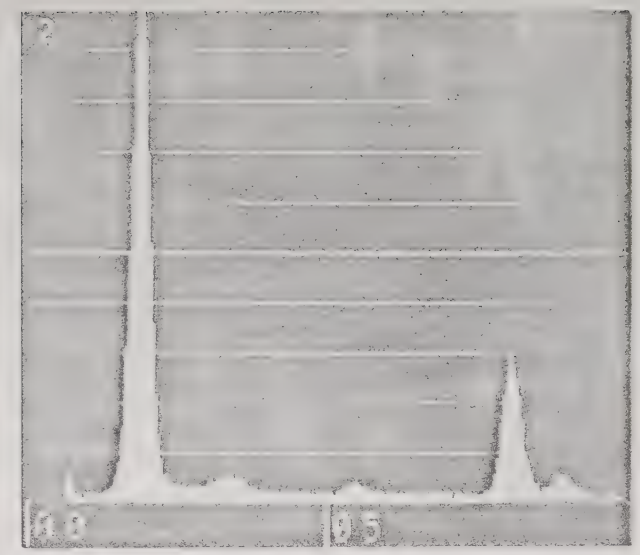
5) Particule métallique de chrome:8.000 X

6) Spectre d'émission X du chrome

1

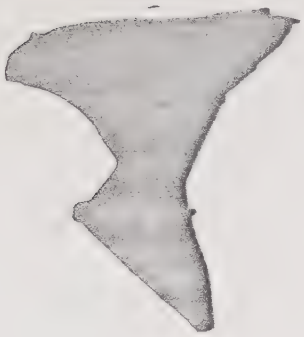
5μm

2



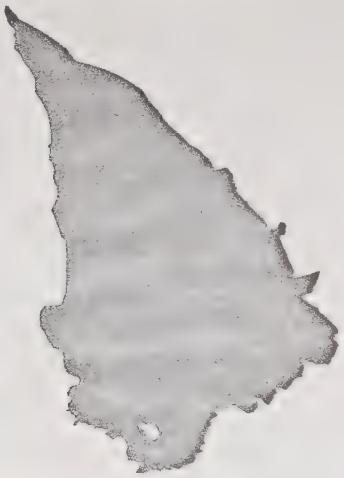
Si

3



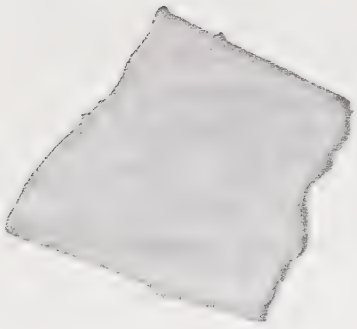
10μm

4



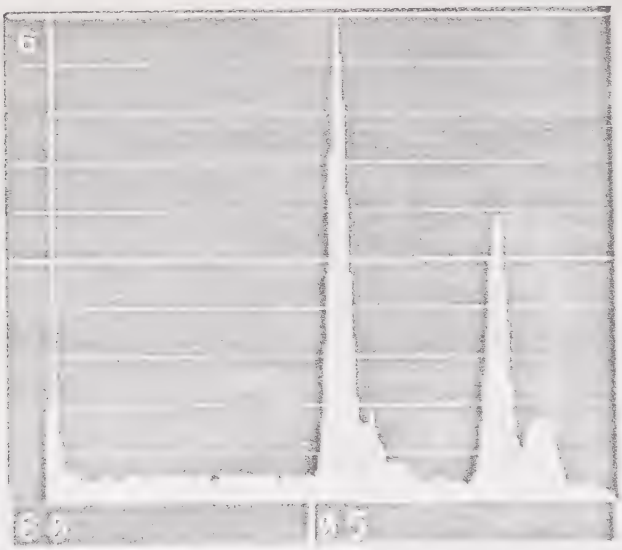
5μm

5



5μm

6



Cr

PLANCHE n° 15

Echantillon n° 3 - lot 1

Soluté injectable du commerce

1) à 4) : particules métalliques de fer avec leur spectre d'émission X

1 : 8000 X

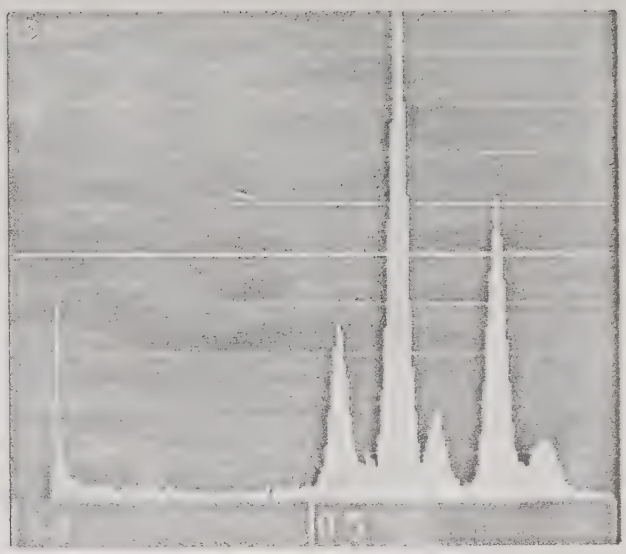
3 : 8000 X

4 : 5200 X

5)et 6) type de particule divers avec son spectre d'émission X, 5200 X

1

5μm

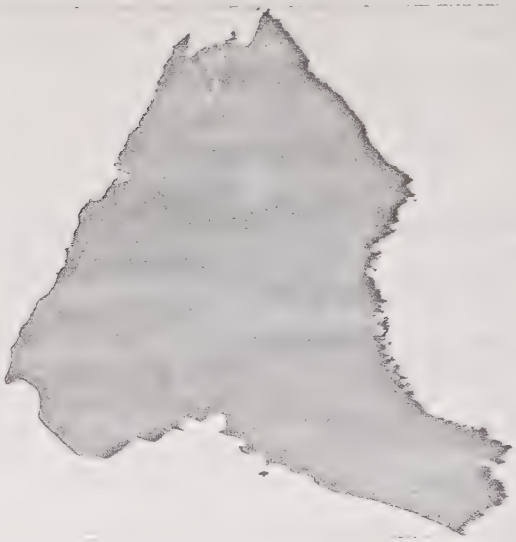


Cr Fe

3

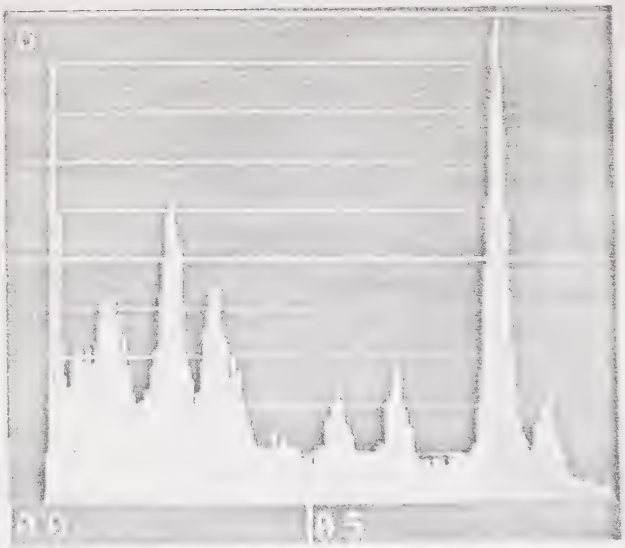
5μm

4



5μm

5μm



Mg Si Cl K Fe

PLANCHE n° 16

Echantillon n° 3 - lot 2

Soluté injectable du commerce

1 à 6 Particules de verre et spectre d'émission X.

1 : 5200 X

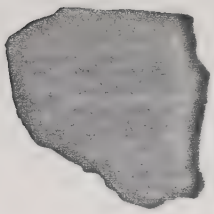
3 : 8000 X

4 : 8000 X

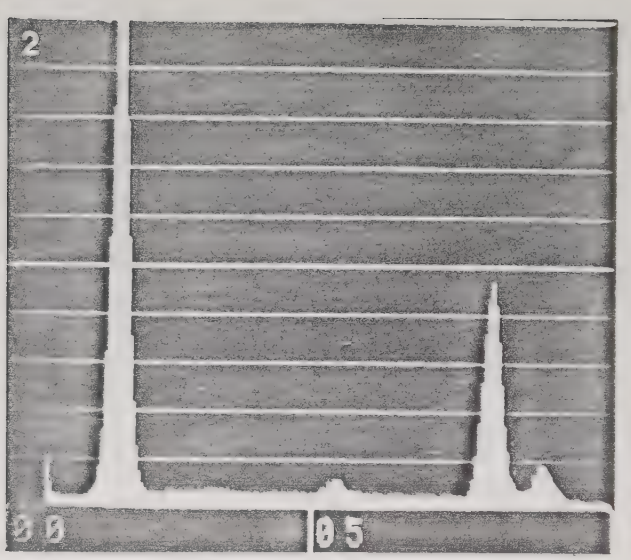
5 : 8000 X

6 : 5200 X

1

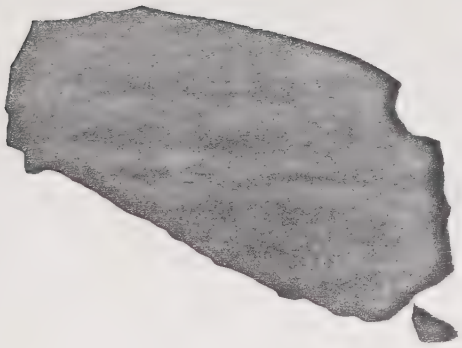


5 μm



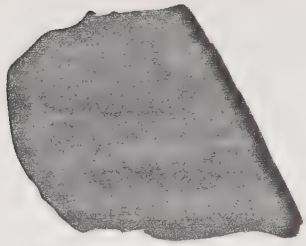
Si

3



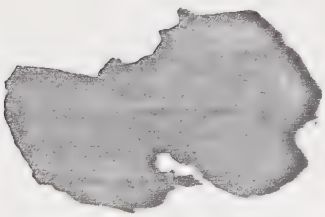
10 μm

4



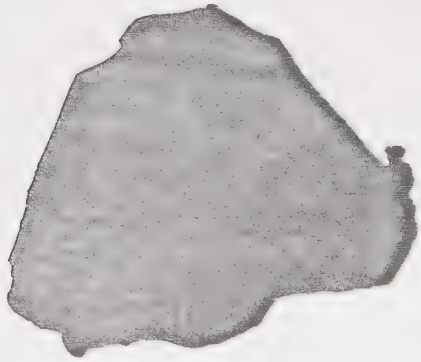
5 μm

5



5 μm

6



5 μm

PLANCHE n° 17

Echantillon n° 3 - lot 2

Soluté injectable du commerce

1 à 4 Particules de la famille G avec leur spectre d'émission X correspondant.

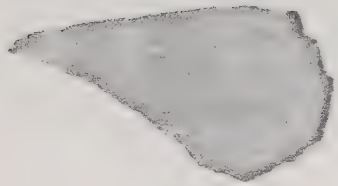
1 : 8000 X

3 : 5200 X

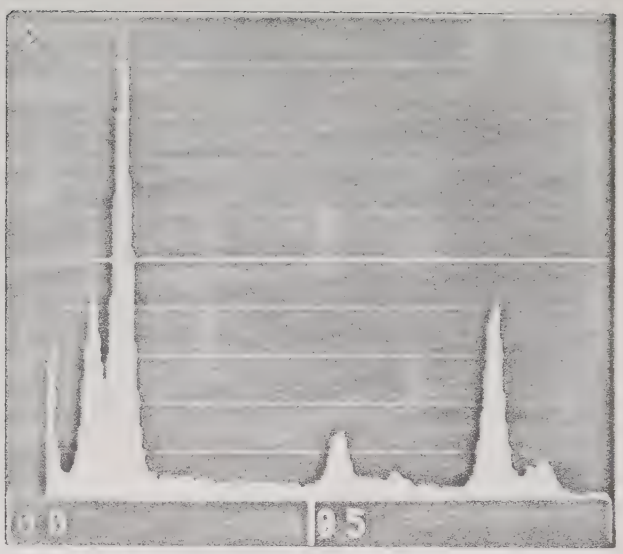
5 et 6 Particule métallique composée de chrome (Kα, Kβ) Zinc (raies Kα et Kβ) et Plomb (raie M er raies

8000 X

1

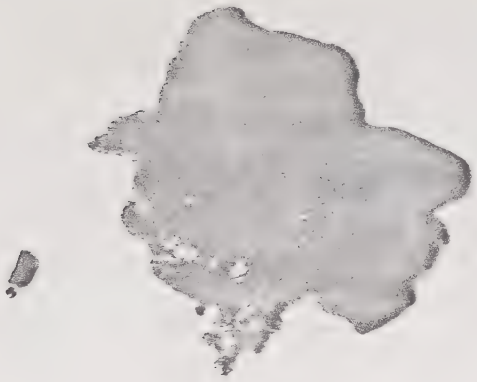


5μm

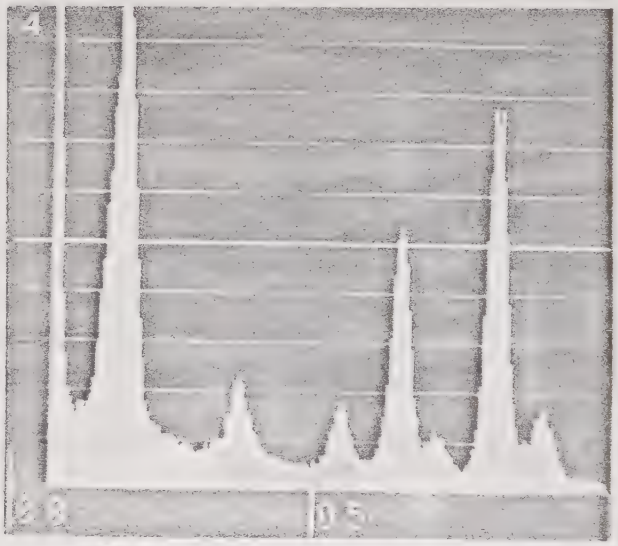


Mg Si

3



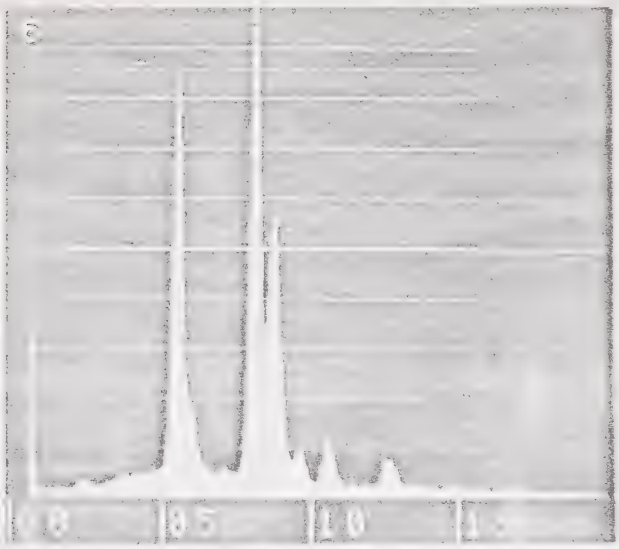
5μm



Si Ca Fe

5

5μm



Pb_M Cr Zn Pb_L

PLANCHE n° 18

Echantillon n° 3 - lot 2

Soluté injectable du commerce.

1 à 4 Particules métalliques de chrome et leur spectre d'émission X

1 : 5200 X

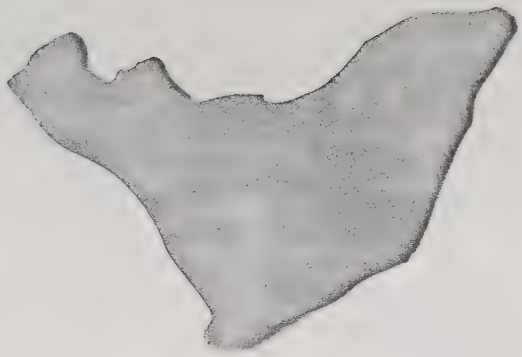
3 : 5200 X

4 : 5200 X

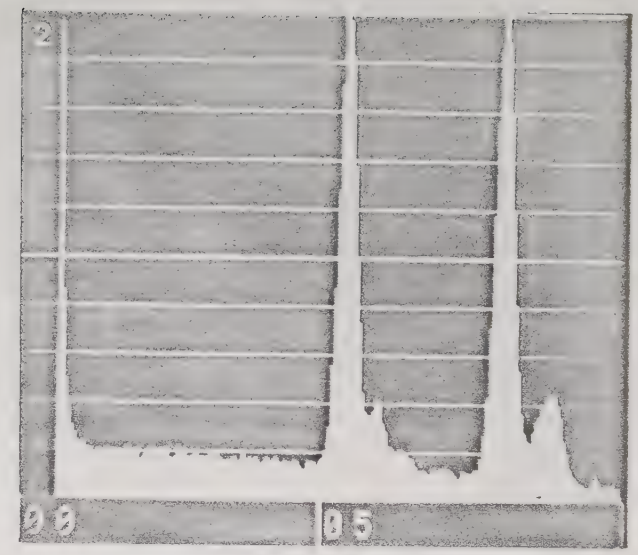
5 et 6 Particule métallique de Fer.

5200 X

1



5μm



Cr

3

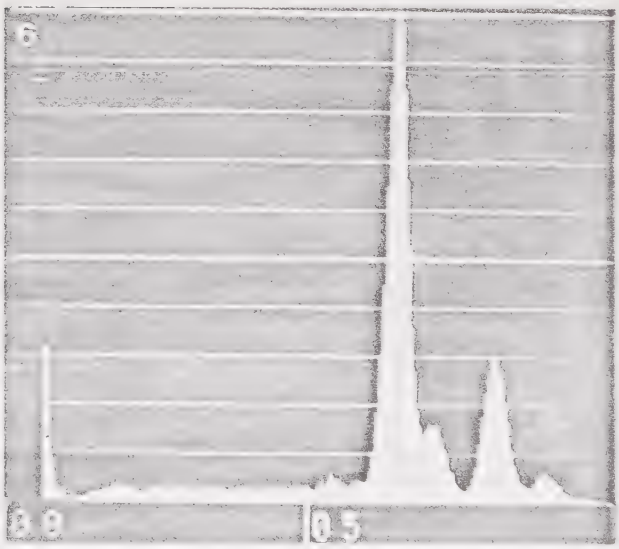
5μm

4

5μm

5

5μm



Fe

PLANCHE n° 19

Echantillon n° 3 - lot 2

Soluté injectable du commerce

1 - 2 et 3 Particules métalliques composées de chrome et de Fer (famille E) et leur spectre d'émission X

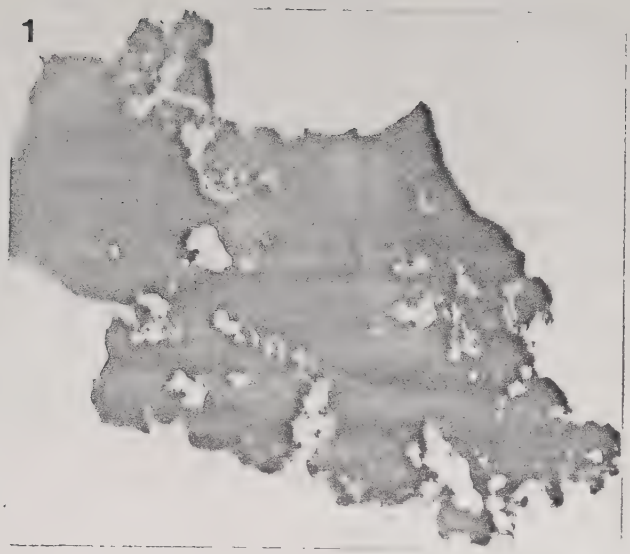
1 : 5200 X

3 : 8000 X

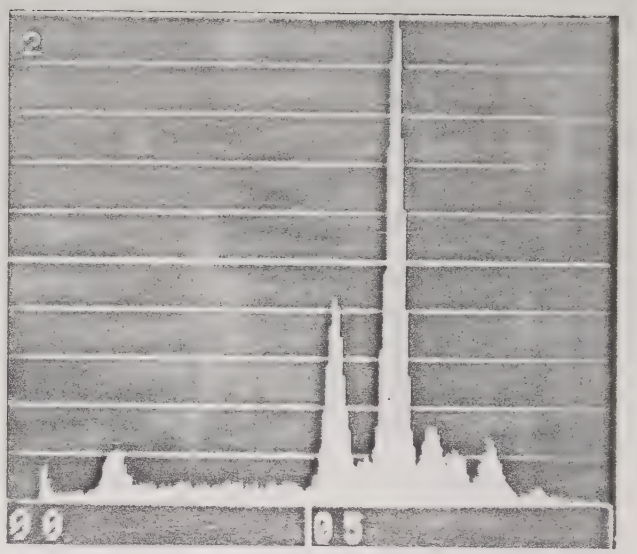
4 - 5 et 6 Particules cristallines de chlorure de sodi et de potassium et leur spectre d'émission

4 : 5200 X

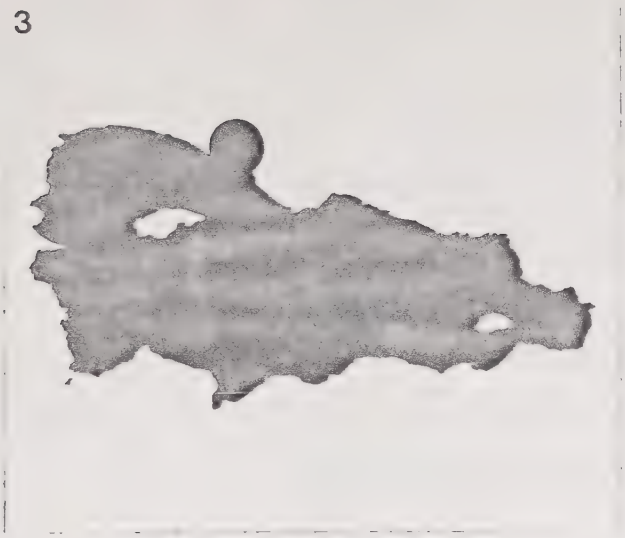
5 : 5200 X



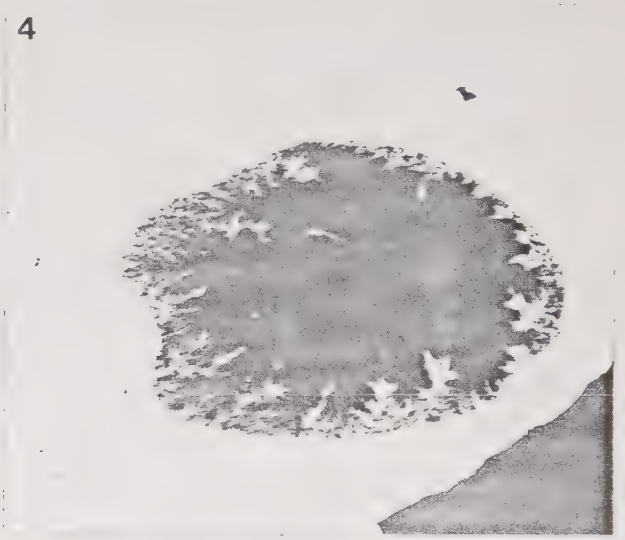
5μm



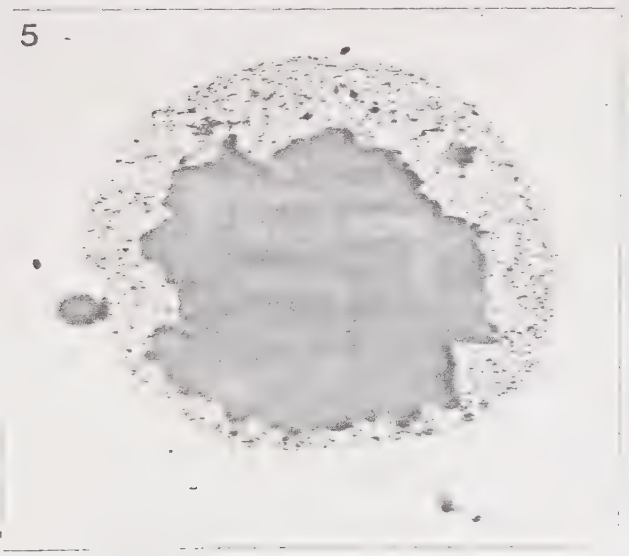
Cr Fe



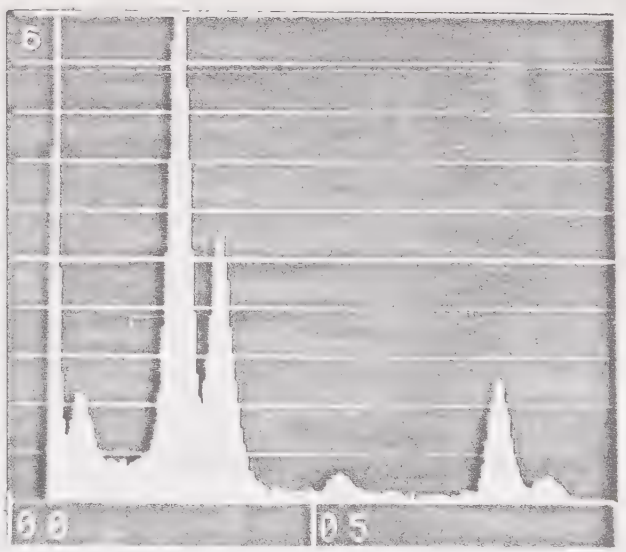
5μm



5μm



5μm



Na Cl K

- Echantillon Nº 4 :

Cet échantillon avait subi une contamination massive, de sorte que nous nous sommes uniquement intéressé aux particules prédominantes. A côté de quelques particules de verre, de taille variant de 2 à 50 µm, nous avons rencontré des particules dont le spectre d'émission X montrait la présence de Soufre et de Baryum. Les plus grosses de ces particules, en forme d'aiguilles, étaient visibles à l'oeil nu dans le soluté, leur taille atteignant parfois 2 à 3 mm ; elles paraissaient constituées d'un enchevêtrement de paillettes cristallines.

- Echantillon Nº 5 :

- La recherche d'amiante dans cet échantillon s'est révélée positive. Quelques fibrilles de Chrysotile ont été trouvées après observation de 5 grilles.

3.2.3. COMMENTAIRES DES RESULTATS.

3.2.3.1. Commentaires généraux :

• Parmi les contaminants minéraux présents dans les solutés étudiés, le verre (famille A) représente une part considérable. Ces particules sont facilement identifiables, d'une part, grâce à leur forme, mais aussi, d'autre part, par comparaison de leur spectre X avec celui de particules de verre témoins obtenues par broyage (pic principal de Silicium, le plus souvent seul et parfois accompagné de Titane, Calcium et Magnésium).

On peut envisager deux origines possibles pour ces particules :

- Libération lors d'une ouverture par effraction (échantillon Nº 3 et 4) ;

- libération à la suite d'une attaque des parois internes du récipient par le soluté.

Dans le premier cas, il est difficile de savoir si la totalité des particules trouvées provient d'une ouverture traumatisante ou bien si une partie d'entre elles était préalablement présente, provenant d'une attaque par le soluté ou d'une verrerie mal lavée. C'est pourquoi, on a intérêt à pratiquer des techniques d'ouverture des ampoules par chalumeau (74, 244).

Dans le cas des échantillons Nº 1 et 2 qui ont été ouverts en retirant le bouchon en élastomère, le verre présent en grande quantité préexiste donc à l'ouverture. Il provient sans doute, pour la plupart, de l'attaque du récipient par le soluté ou de particules préexistantes.

L'attaque du verre par un soluté peut se manifester de deux façons (6, 129, 132, 133) :

- Dans le cas d'une attaque par l'eau ou les solutions acides, il se produit un phénomène d'échange et de diffusion des ions alcalins et alcalino-terreux de la structure du verre vers la solution. C'est donc un phénomène de décharge alcaline. Nous reviendrons plus loin sur le cas de l'échantillon Nº 4 qui constitue un bon exemple du phénomène d'échange d'ions.

- Dans le cas d'une attaque par une solution basique ou une solution saline, les liaisons homéo-polaires qui unissent les atomes de Silicium aux atomes d'Oxygène subissent un clivage qui entraîne la destruction en surface de la structure du verre

et la libération de particules et paillettes de verre. C'est ce qui s'est produit dans les solutions salines que nous avons étudiées (échantillons Nº 1 et 2).

• La famille de particules G est, comme le verre, constituée essentiellement de Silicium accompagné de quelques autres éléments. L'aspect de ces particules siliceuses ainsi que leur spectre les différencient cependant tout à fait des particules de verre. Des études, réalisées au Centre de Microscopie Electronique de l'Institut Pasteur de Lyon sur les particules atmosphériques, nous permettent de penser que ces particules peuvent provenir de l'air des ateliers de fabrication de l'un ou l'autre des constituants du soluté.

• Enfin, on rencontre de façon constante des particules métalliques (familles B, C, D, E) arrachées sans doute aux parois des matériaux de remplissage et aux pièces en mouvement. Elles peuvent provenir également des bouchons en élastomère ou bien d'un récipient de propreté insuffisante. Elles sont constituées, le plus souvent, soit de Fer, soit de Chrome, soit d'alliages à base de ces deux éléments. Leurs formes, plutôt irrégulières, sont caractéristiques (45).

• Les deux lots de l'échantillon Nº 3, bien que fabriqués sur deux chaînes différentes et conditionnés dans des ampoules de provenances différentes, présentent une contamination qualitativement semblable.

D'autre part, on constate que malgré une filtration sur membrane de faible porosité pratiquée pour la plupart de ces solutés avant le conditionnement, on trouve des particules de taille supérieure au diamètre des pores des filtres. On peut donc penser soit que la filtration a été mal conduite, soit, plus vraisemblablement, qu'une source importante de ces particules est constituée par le conditionnement (particules préexistantes).

• L'origine des particules de la famille F peut être attribuée soit aux agents isotonisants du soluté, soit au phénomène de migration des ions alcalins du verre vers la solution, ce qui est peut-être vraisemblable, le soluté ayant un pH acide.

• Dans aucun des quatre premiers échantillons nous n'avons trouvé de traces d'amiante ; par contre, cette recherche s'est révélée positive dans l'échantillon Nº 5 :

- quelques fibrilles de Chrysotile ont pu être mises en évidence après observation de plusieurs grilles. Toutefois, il s'agit là d'une contamination très faible.

3.2.3.2. Commentaire particulier à l'échantillon Nº 4 :

Il nous paraît intéressant, à titre d'exemple, de relater plus en détails le cas de la contamination particulaire de l'échantillon Nº 4 et de montrer ainsi l'apport d'une méthode d'analyse rapide des particules pour la résolution d'un problème industriel.

L'analyse des cristaux contaminants en microscopie électronique analytique ainsi que des études complémentaires ayant établi qu'il s'agissait de Sulfate de Baryum, il fallait alors rechercher, d'une part, la provenance du Baryum et, d'autre part, celle du Soufre, afin d'élucider le mécanisme de la contamination.

• PROVENANCE DU BARYUM :

Les essais du laboratoire d'analyse ayant montré que ni les matières premières, ni l'eau, ne pouvaient être incriminées, les recherches se sont tournées en premier lieu vers les différents ballons et tubes en verre utilisés pour la préparation du soluté et dans le circuit de remplissage. Le remplacement de toutes ces pièces en Pyrex par des récipients en Inox ou des seringues en plastique ne diminue pas le phénomène de contamination.

Dans ces conditions, les ampoules en verre neutre blanc borosilicaté qui présentent dans leur formule 3 % de BaO ont été pressenties comme pouvant être à l'origine du Baryum. A titre comparatif, des ampoules bouteilles d'origine et de composition différentes ainsi que des ampoules à deux pointes ont été remplies avec la solution médicamenteuse.

Le phénomène se retrouve dans tous les cas, mais avec une intensité plus ou moins grande. C'est ainsi que les ampoules bouteilles sont plus réactives que les ampoules deux pointes.

Dans le cas des ampoules bouteilles, un anneau opalescent se forme à la base de l'ampoule après 3 à 4 jours ; cet anneau se détache et passe en suspension après 5 à 8 jours pour former des cristaux de $BaSO_4$. Si l'ampoule est soudée et conservée tête en bas, l'anneau et les cristaux se forment au niveau de la soudure dans les mêmes délais. Le corps de l'ampoule n'est pas altéré.

Il est essentiel de noter que le phénomène évolue dans le temps et que la libération de baryum semble localisée aux points de chauffe lors de la fabrication des ampoules ou de leur soudure.

Cependant, les valeurs de cession alcaline sur les lots contrôlés sont très inférieures aux limites des pharmacopées.

De plus, les industriels verriers assurent que leur production a la même composition depuis 1971 et estiment que si la cristallisation était due à une variation de formule du verre, il faudrait que les autres types de verre testés et donnant lieu au phénomène aient subi une modification de formule identique, ce qui paraît peu vraisemblable.

Le laboratoire pharmaceutique assure également en contre-partie que sa formule, elle non plus, n'a pas varié, et que jusqu'ici aucun problème de fabrication identique ne s'était produit.

En conclusion, s'il apparaît que le Baryum provient du verre des ampoules, il reste à déterminer le mécanisme de formation du précipité.

• PROVENANCE DES SULFATES :

La formule de la solution contient du Camphosulfonate de Sodium et du Sulfite de Sodium utilisé comme anti-oxydant. Des essais ont prouvé que l'absence de l'un de ces deux constituants suffisait à supprimer les cristallisations. De même, la précipitation diminue avec la concentration en Sulfite de Sodium, la réponse devient plus tardive et va même jusqu'à s'annuler.

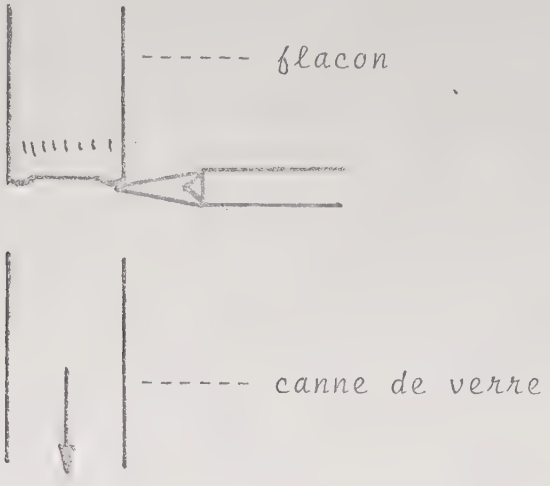
Les Sulfates proviennent donc bien de la solution médicamenteuse. On peut se demander s'il s'agit là du seul facteur déclanchant la cristallisation, ou bien, au contraire, si ce n'est que l'un des facteurs déclanchants. Il restait donc, pour répondre à cette question, à expliquer le mécanisme de formation des cristaux de $BaSO_4$.

• ESSAI D'EXPLICATION DE LA FORMATION DES CRISTAUX DANS CE TYPE D'AMPOULE BOUTEILLE : MECANISME DE LA CONTAMINATION :

D'après BOURGEOIS (25), les conditions thermiques de formation du fond des récipients à partir des cannes de verre sont particulièrement déterminantes sur les valeurs de cessions alcalines obtenues ensuite sur les récipients réalisés.

On sait que les conditions de façonnage telles que températures de flammes, temps de contact de ces flammes avec le verre, distance de la flamme par rapport au verre, atmosphère et températures de recuisson, nature des gaz, sont autant de paramètres qui peuvent avoir une incidence considérable sur les valeurs de

cessions alcalines obtenues sur les récipients terminés. Les facteurs primordiaux sont les facteurs température et temps. Le schéma ci-dessous représente le principal de la manipulation et les phénomènes observés.



Ainsi, par exemple, une variation de 1 mm seulement de la distance flamme-ampoule a une répercussion sensible sur les résultats de neutralité.

Il importe donc, dans un verre de qualité, que les liaisons de structure soient les plus serrées possibles, de manière à éviter, lors d'une agitation moléculaire d'origine thermique, comme c'est le cas au cours du façonnage d'ampoules ou de flacons, que cette structure se trouve sensiblement modifiée par la rupture des liaisons lâches, en particulier des liaisons des ions à grand rayon ionique et à faible charge électrique, ce qui est le cas pour les ions alcalins et alcalino-terreux.

De plus, lors de la recuisson, les ampoules sont en dépression pendant la phase de refroidissement. Il est donc important d'éliminer par une ventilation adéquate les vapeurs alcalines qui peuvent se former dans le four de recuisson, afin d'éviter une aspiration de ces vapeurs dans les ampoules pendant le refroidissement.

Ce seront donc ces paramètres qui auront tendance, en fonction des conditions de chauffage pour la formation des ampoules, puis de celles de recuisson, à entraîner une modification plus ou moins profonde de la structure de base du verre initial.

Comme nous l'avions noté, les ampoules ont satisfait le test de neutralité CODEX ; cependant, une mince bande à 2 mm du fond de l'ampoule a perdu sa neutralité de surface lors de la fabrication et de la recuisson. Ces anneaux sont d'ailleurs très légèrement visibles sur les ampoules vides lors d'un mirage à contre-jour sur fond sombre.

C'est au niveau de cet anneau que la cristallisation démarre, 3 ou 4 jours après le remplissage des ampoules par la solution. Dans un premier temps, l'anneau s'opacifie et devient plus net ; après une évolution de quelques jours, il se détache de la paroi du verre et passe dans la solution. Le même phénomène se produit au niveau de la soudure du col de l'ampoule.

Cette évolution du phénomène dans le temps correspond à une attaque progressive par couche successives de l'ampoule, ainsi que le montre l'étude de la décharge hydrolytique du verre réalisée par BOURGEOIS (25). Lors de la mise en contact du verre et d'une solution aqueuse, ce sont donc les ions alcalins, puis les alcalino-terreux, qui se trouveront les premiers mis en solution, leurs forces de liaison étant trop faibles pour s'opposer à l'action hydrolytique. La solution ainsi progressivement enrichie en éléments basiques va contribuer à attaquer de plus en plus rapidement le réseau vitreux,

prenant une allure de réaction en chaîne au fur et à mesure que la concentration en éléments basiques augmente. La présence de Sulfites et de Camphosulfonates dans la solution permet de neutraliser les alcalins en formant en surface des Sulfates alcalins insolubles. Le phénomène est d'ailleurs connu des verriers puisqu'ils l'utilisent couramment pour le traitement interne superficiel par le SO_2 des verres qui ne sont pas neutres dans la masse.

• ETUDE QUANTITATIVE DU PHENOMENE :

Le filtrat de 20 ampoules contaminées a été recueilli, lavé, séché et pesé, soit 2,2 mg.

Le précipité recueilli, à l'exception de quelques débris de verre, est constitué, de façon majoritaire, de cristaux de $BaSO_4$.

Donc, une ampoule libère 0,11 mg de $BaSO_4$ en moyenne.

- Poids moléculaire du $BaSO_4$ = 233,4
- Poids moléculaire du BaO = 153,36

Donc, 0,11 mg de $BaSO_4$ représentent 0,0722 mg de BaO par ampoule.

D'après sa formule, ce verre contient 3 % de BaO. Le poids moyen d'une ampoule est de 2,67 g.

On peut estimer la surface d'attaque d'une ampoule au niveau de l'anneau à 1/20e de la surface totale, ce qui donne :

$$2,67 \times \frac{1}{20} \times \frac{3}{100} = 0,004 \text{ g de BaO}$$

soit 4 mg de BaO libérables [illegible]

Le précipité de Sulfate de Baryum obtenu dans une ampoule correspond donc environ au $1/50^{e}$ de la valeur maximale que pourrait produire cette attaque. Les valeurs de BaO libérable calculées à partir des mesures de décharge alcalines réalisées sur le verre donnent :

$1{,}34\ 10^{-3}$ mg de BaO par ampoule,

soit, comparées à la valeur de 0,0722 mg de BaO libéré, environ 50 fois moins que dans la réalité.

Ceci montre bien que les essais de décharge alcaline réalisés sur la masse du récipient dissimulent la possibilité d'une zone localisée de fragilité de la surface interne du verre telle qu'elle existe sur les récipients étudiés. En conséquence des essais de neutralité de surface semblent donc nécessaires, même en ce qui concerne un verre apparaissant comme neutre dans la masse.

• EN CONCLUSION de cette enquête, IL APPARAIT NETTEMENT QUE :

- Le Baryum provient du verre (190).
- La libération de Baryum par l'ampoule est localisée à des zones de perte de neutralité du verre et le phénomène évolue dans le temps.
- La précipitation est liée à un excès de Sulfite de Sodium dans la formule du soluté.

La présence de Soufre en quantité importante dans la formule du soluté était donc un facteur prédisposa[illegible] à l'apparition d'un tel incident, une baisse [illegible]

qualité des récipients fournis par le transformateur semble avoir été le facteur déclanchant de l'incident. En effet, l'accélération des cadences pour améliorer la rentabilité ne peut se faire qu'en augmentant les débits de gaz et d'oxygène, d'où l'obtention de flammes plus chaudes et le risque de dégradation de la structure du fond des récipients. Ce risque est plus élevé en ce qui concerne les flacons et les ampoules bouteilles, sans doute en raison de la viscosité plus importante des verres qui les constituent et qui impose un façonnage des fonds avec des flammes plus chaudes.

3.3. RECHERCHE D'AMIANTE DANS LES TALCS D'ORIGINES DIVERSES -

3.3.1. RAPPELS MINERALOGIQUES SUR LE TALC ET L'AMIANTE. (192, 193)

Les talcs sont des silicates de Magnésium hydratés et appartiennent donc à une même famille minéralogique que les amiantes.

Le talc cependant, contrairement aux amiantes, est un silicate non fibreux, de structure lamellaire. Il faut signaler pourtant que certains talcs sont fibreux ou à tendance asbestiforme, c'est-à-dire qu'ils présentent un pourcentage de fibres qui ne sont pas pour autant systématiquement des fibres d'amiante.

Les talcs lamellaires sont ceux qui possèdent les meilleures propriétés lubrifiantes car ils permettent le glissement des lamelles qui se superposent.

3.3.2. NATURE ET ORIGINE DES ECHANTILLONS ETUDIES.

Nous avons étudié trois types d'échantillons :

- des produits en provenance de l'Etranger, c'est-à-dire des talcs provenant des principaux pays producteurs (Echantillons E 1 à E 9) ;
- des échantillons de fournisseurs, c'est-à-dire de revendeurs (échantillons F 1 à F 8) ;
- des produits finis, entrant dans la gamme de produits cosmétiques d'un laboratoire français (G 1 et G 2).

Référence	Nature de l'échantillon	Année du lot
E 1	Talc Mexique.....	1972
E 2	Talc Espagne.....	1973
E 3	Talc U.S.A.	-
E 4	Talc Venezuela.....	1972
E 5	Talc Venezuela.....	1973
E 6	Talc Brésil.....	1975
E 7	Talc Brésil.....	1974
E 8	Talc Brésil.....	1974
E 9	Talc Brésil.....	1974
F 1	Talc italien fournisseur 1.	1974
F 2	Talc fournisseur 1.....	1974
F 3	Talc italien fournisseur 2.	1971
F 4	Talc fournisseur 1.....	1975
F 5	Talc fournisseur 2.....	1975
F 6	Talc italien fournisseur 1.	1974
F 7	Talc fournisseur 3.....	1974
F 8	Talc français fournisseur 2	1975
G 1	Talc toilette	
G 2	Talc toilette	

3.3.3. RESULTATS.

Nous présentons dans le tableau suivant les résultats d'une recherche qualitative d'amiante dans les lots de talcs étudiés. Les planches Nº 20, 21, 22, 23, illustrent ces résultats.

Référence	Chrysotile	Amphibole	Remarques
E 1	0	0	talc non fibreux
E 2	0	0	talc en grosses particules, assez denses, non feuilletées présence de particules allongées, fibreuses
E 3	+	0	quelques très rares fibrilles isolées
E 4	0	++++	présence de très nombreuses fibres de Trémolite
E 5	+	0	quelques rares fibrilles
E 6	++	0	quelques fibres et fibrilles
E 7	0	0	talc de granulométrie fine, formé de fragments lamellaires, non fibreux
E 8	0	0	talc à grosse granulométrie, peu fibreux
E 9	0	0	non fibreux

Référence	Chrysotile	Amphibole	Remarques
F 1	0	0	particules plutôt denses, talc assez fibreux
F 2	+	0	une petite fibrille d'amiante a été observée après recherche sur trois grilles
F 3	0	0	non fibreux
F 4	0	0	talc dense, quelques rares fibres de talc
F 5	0	0	non fibreux
F 6	0	0	peu fibreux
F 7	0	0	peu clivé, grains massifs, non fibreux
F 8	0	0	non fibreux
G 1	0	0	-
G 2	0	0	-

On constate donc que sur 19 échantillons examinés, 14 sont exempts de fibres d'amiante.

Parmi les 5 lots renfermant de l'amiante, 4 sont contaminés par de très rares fibrilles de Chrysotile et un est très contaminé par de l'amphibole Trémolite. Ce sont, respectivement : E 3, E 5, E 6, F 2 et E 4.

PLANCHE n° 20

Particules de talc et leur spectre d'émission X

Les planches 4, 5 et 6 montrent des particules lamellaires et plissées, qui, observées sur la tranch peuvent être confondues avec des fibres d'amiante.

1 : 10.000 X

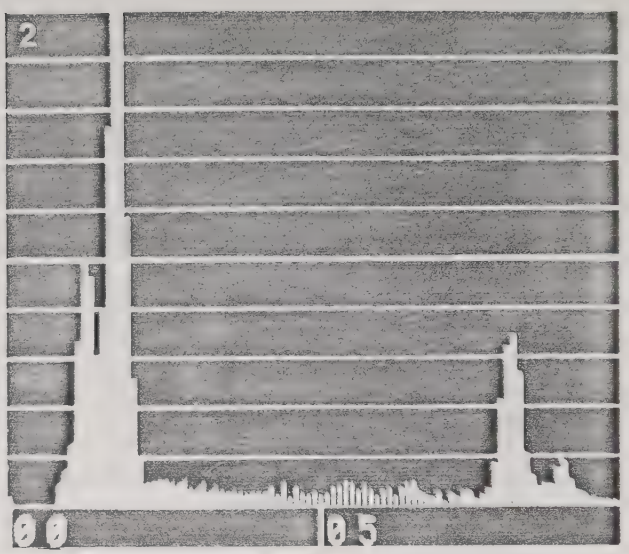
3 : 1.700 X

4 : 10.000 X

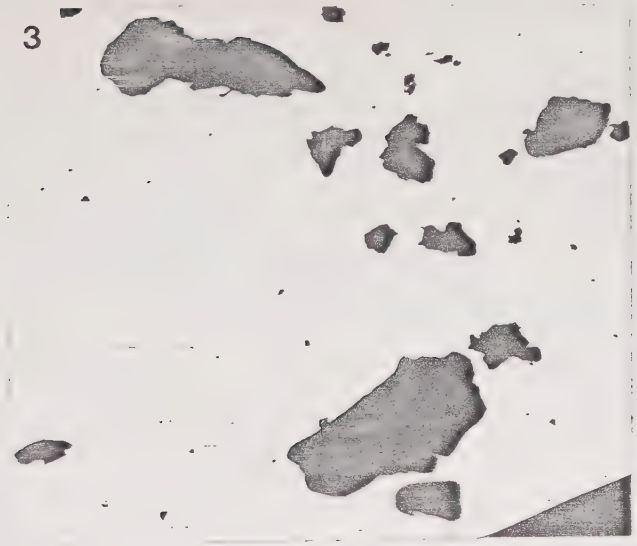
5 : 28.000 X

6 : 5.200 X

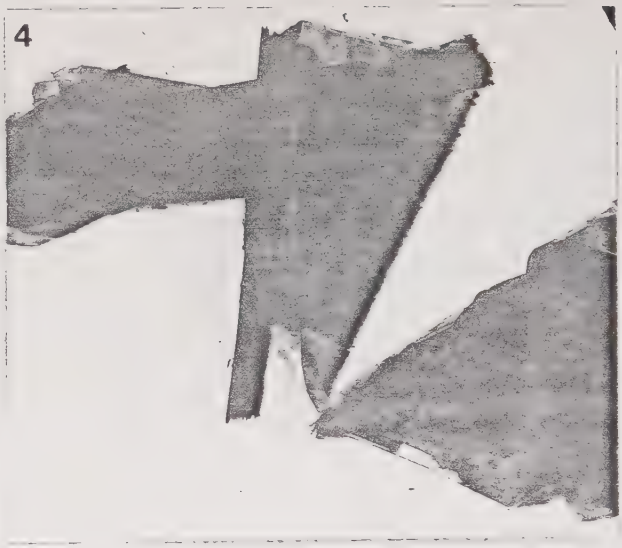
2μm



Mg Si

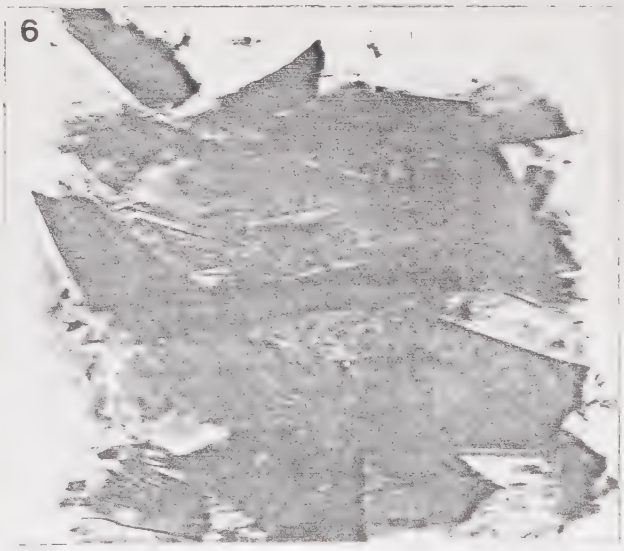


20μm



2μm

1μm



5μm

PLANCHE n° 21

Particules de Talc

Ces particules sont fibreuses ou plissées et peuvent être confondues avec des fibres d'amiante. Le spectre d'émission X permet leur identification.

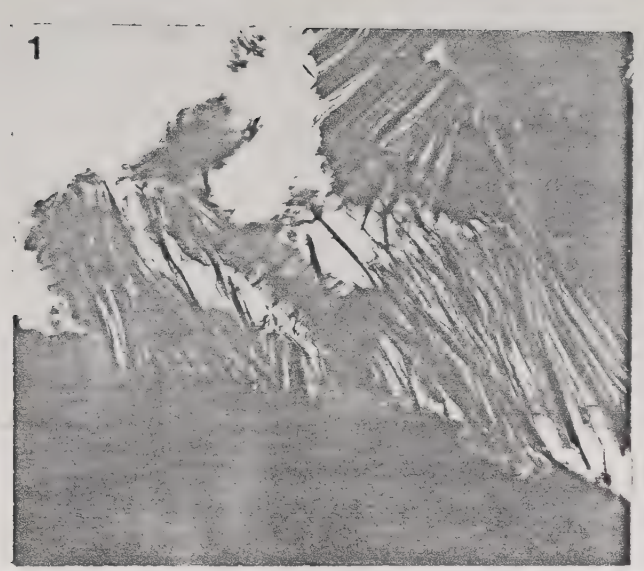
1 : 9400 X

3 : 8200 X

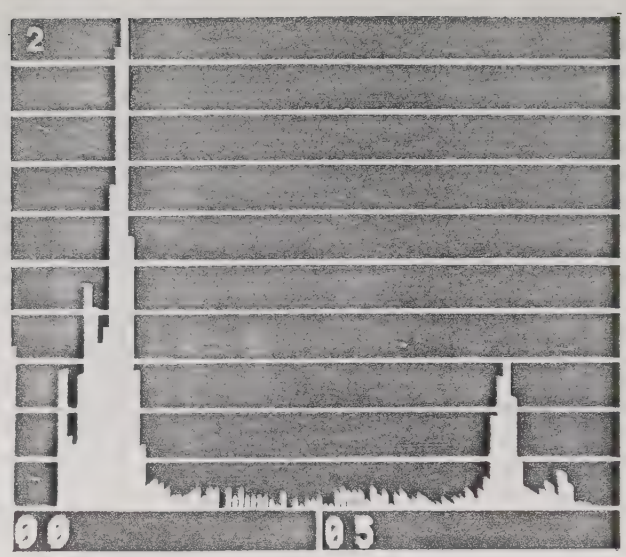
4 : 5200 X

5 : 5200 X

6 : 22000 X



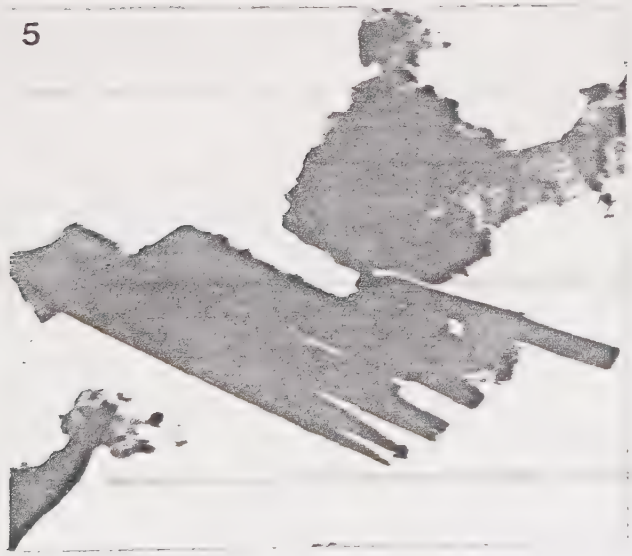
5μm



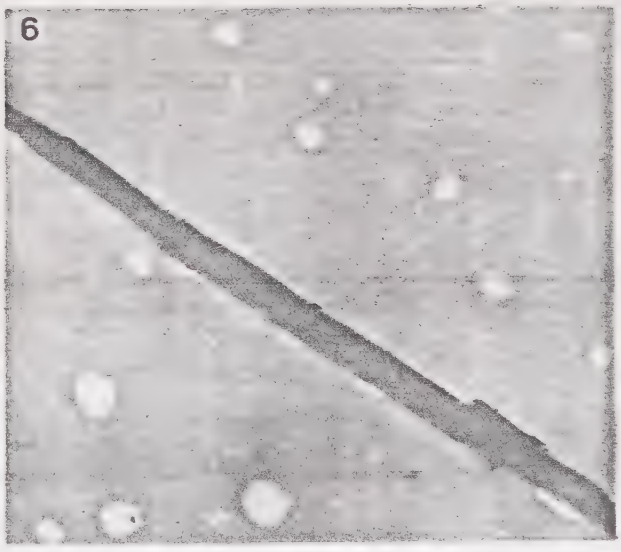
Mg Si

5μm

5μm



5μm



10μm

PLANCHE n° 22

Particules fibreuses de Talc.

Le spectre d'émission X de ces particules est caractéristique du talc et permet de les différencier des amiantes amphiboles.

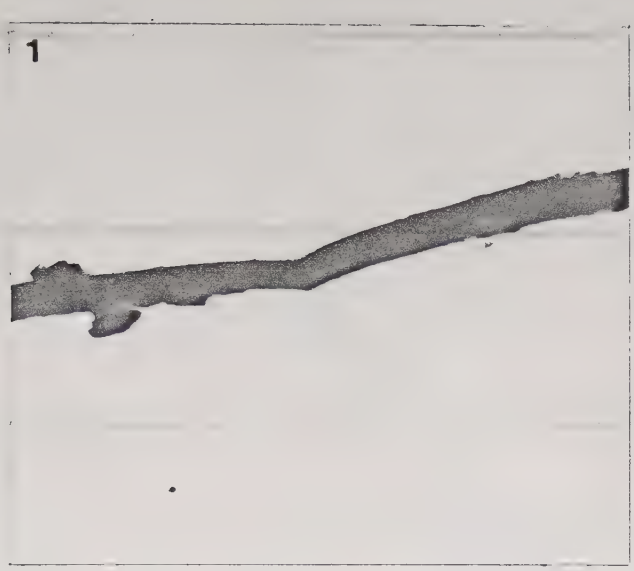
1 : 10.000 X

3 : 10.000 X

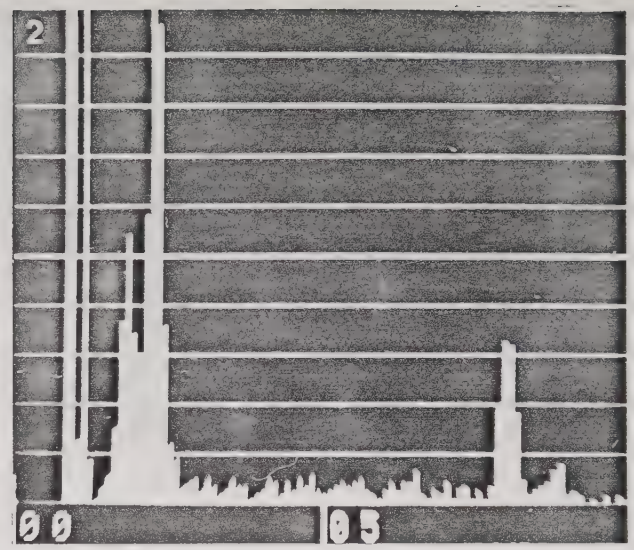
4 : 22.000 X

5 : 10.000 X

6 : 22.000 X



2 μm

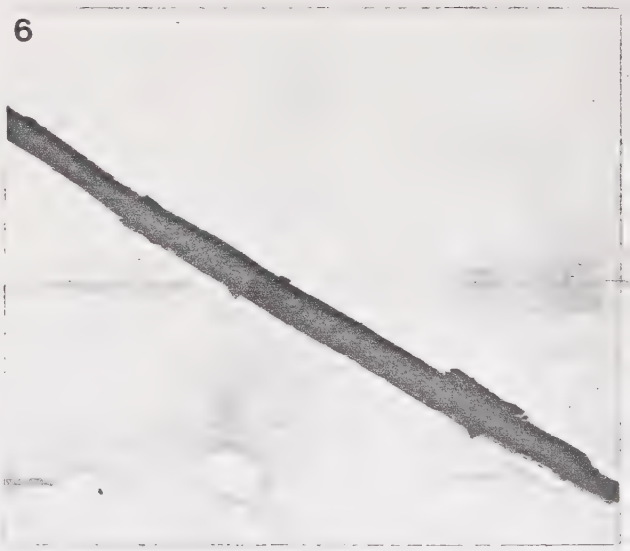


Mg Si

2 μm

1 μm

2 μm



1 μm

PLANCHE n° 23

Amiante Chrysotile
trouvé dans des talcs

1 : fibrille isolée : 28.000 X

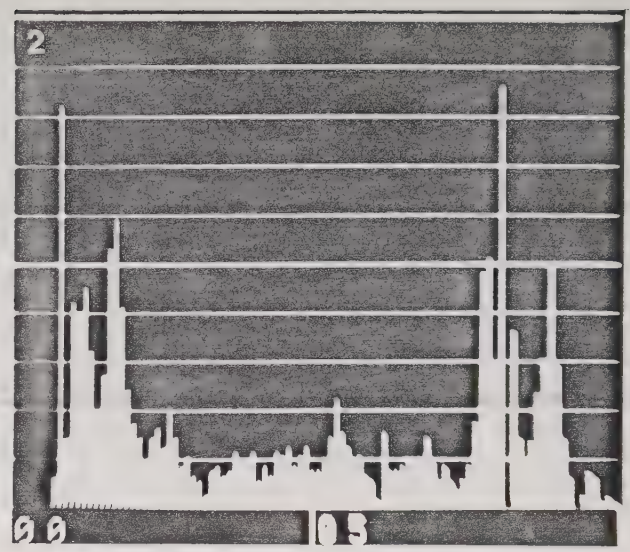
3 : fibrilles : 45.000 X

4 : fibre : 17.000 X

5 : fibre : 28.000 X

6 : fibre : 28.000

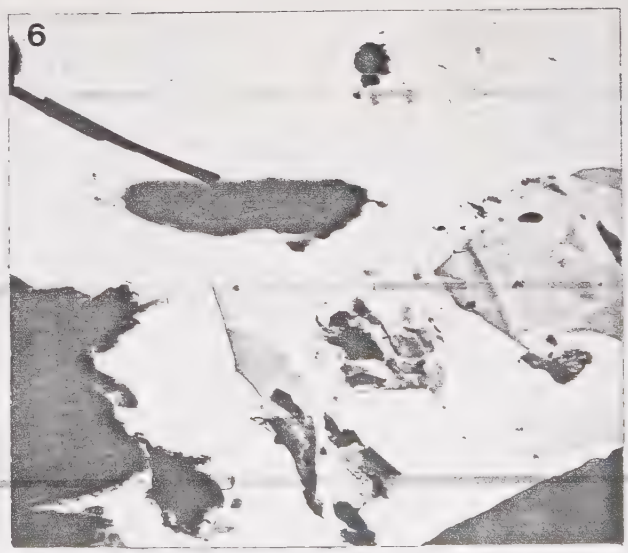
1 μm



1 μm

2 μm

1 μm



1 μm

PLANCHE n° 24

1 et 3 Particule de Sulfate de Baryum et son spectre d'émission X, trouvée dans l'échantillon de soluté injectable n° 4 : 4.200 X

2 Fibrilles d'amiante Chrysotile trouvées dans l'échantillon de soluté injectable n° 5 : 45.0

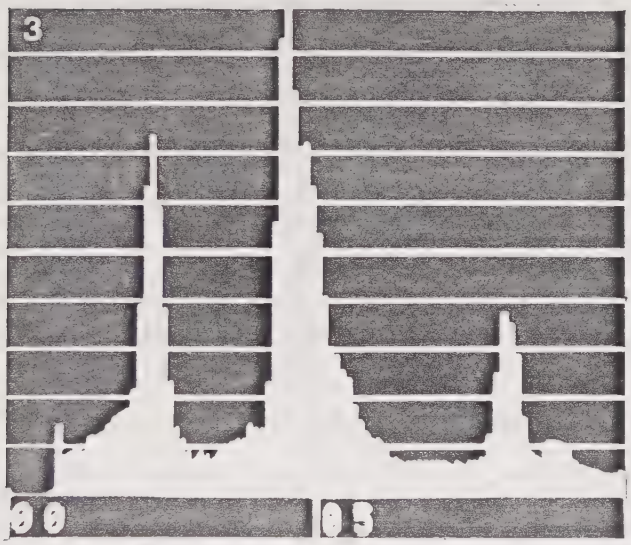
4 - 5 et 6 Fibres de Trémolite et leur spectre d'émission X trouvées dans l'échantillon de talc E4

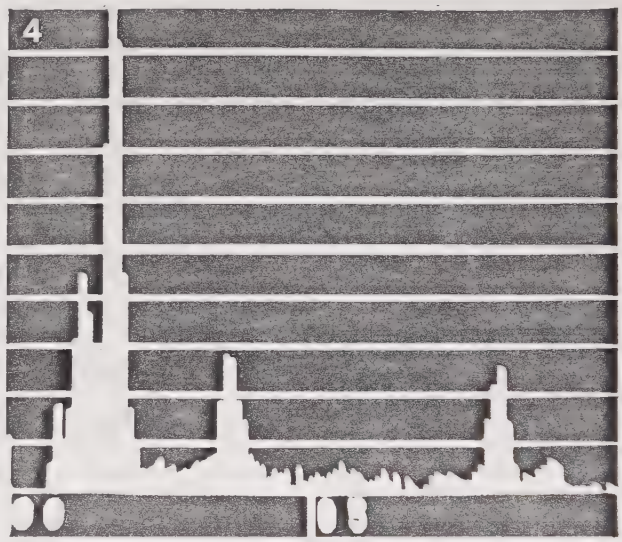
5 : 3.400 X

6 : 2.200 X

5μm

1μm





10μm

10μm

3.3.4. COMMENTAIRES DES RESULTATS.

La recherche d'amiante dans le talc est sans doute plus délicate que dans tout autre échantillon. D'une part, en effet, un certain nombre de talcs sont de forme fibreuse, c'est-à-dire ont une apparence asbestosique et, d'autre part, la composition chimique du talc est voisine de celle des amiantes. Les possibilités de confusion sont donc certaines, tant au niveau de l'observation au microscope électronique qu'en microanalyse par émission X.

C'est ainsi que quelques photographies que nous présentons montrent le risque de confusion avec de l'amiante de certains talcs lamellaires, lorsqu'ils sont plissés ou observés sur la tranche. De même, certains talcs montrent des fibres. Dans tous ces cas, le spectre d'émission X montre une relative constance puisque le pic Kα de Silicium est en général environ deux fois plus haut que le pic Kα de Magnésium, ce qui correspond à un rapport des intégrales respectives des surfaces sous la courbe de 2,4 environ. Ces caractéristiques, liées à l'absence de pic de Fer (raies Kα), montrent bien que ce spectre d'émission X du talc diffère de celui des témoins d'amiante U.I.C.C. De plus, d'une variété de talc à l'autre, le spectre d'émission X conserve de façon assez constante ces caractéristiques.

L'amiante Trémolite, dont l'U.I.C.C. ne fournit pas de témoins, est un type d'Amphibole qui diffère du talc par son contenu en Calcium (41), cet élément étant caractéristique sur le spectre d'émission X.

Nous avons également constaté que les caractères morphologiques et granulométriques des talcs sont assez divers en fonction de leur origine.

Les talcs contaminés proviennent des Etats-Unis, du Venezuela, du Brésil et d'un fournisseur.

Les talcs italiens étudiés n'étaient pas contaminés, alors qu'on les cite souvent comme tels en raison de la proximité des gisements d'amiante et de talc dans ce pays (41, 158).

Une estimation quantitative du niveau de contamination par le Chrysotile, calculée à partir de la quantité de talc déposée sur chaque grille, montre qu'il s'agit d'une contamination extrêmement faible, de l'ordre de moins de 1 pour 1.000.

En ce qui concerne l'échantillon contaminé par l'amiante Trémolite, on peut estimer la contamination à près de 10 % en particules comptées.

3.4. DISCUSSION - CRITIQUE GENERALE DE NOTRE TRAVAIL -

3.4.1. METHODE.

- FACTEURS DE LIMITATION DE LA METHODE :

Cette méthode permet d'obtenir très rapidement des résultats qualitatifs ; ceux-ci sont limités cependant aux éléments de numéro atomique supérieur ou égal à 11 (Na) qui seuls peuvent être détectés, les rayons X des éléments de numéro atomique inférieur ne

franchissant pas, en raison de leur faible énergie, la fenêtre de Beryllium qui protège le détecteur. De plus, une destruction des particules organiques intervient lors de la préparation des échantillons.

D'autre part, cette méthode favorise l'étude des particules de taille intermédiaire, allant de 0,5 à 50 µm environ. En effet, les particules de très grande taille ont peu de chances d'être analysées en nombre représentatif puisqu'elles sont plutôt rares à la surface de la grille, l'observateur tendant à les négliger. De même, les plus petites particules, de l'ordre de grandeur inférieur au micromètre, sont plus difficilement analysables car leur taille est inférieure au diamètre de la sonde électronique.

Un paramètre important de l'efficacité de la méthode est constitué par la préparation de l'échantillon qui doit être reproductible et lui assurer un caractère représentatif. Ceci est particulièrement important pour les études quantitatives, et en particulier les comptages de fibres d'amiante.

Parmi les méthodes de préparation des grilles, les méthodes par dissolution du filtre nous paraissent les plus adaptées aux comptages de particules et de fibres, puisqu'elles suppriment les étapes intermédiaires laborieuses pour faire passer les particules du filtre à la grille.

o EVALUATION DE LA SENSIBILITE DE LA METHODE POUR LA DETECTION DE L'AMIANTE :

A titre indicatif, une fibrille de Chrysotile de 100 nm x 34 nm de diamètre correspond à un poids de $2,3\ 10^{-7}$ ng.

En estimant à 1 µg la quantité de particules déposées sur une grille, une fibrille de 1 µm de long trouvée sur l'observation d'une grille représenterait $2,3\ 10^{-6}$ ng de Chrysotile, soit $2,3\ 10^{-9}$ µg, soit une partie pour un milliard.

On constate donc une sensibilité très supérieure aux autres méthodes. En particulier, la détection du Chrysotile dans le talc par analyse thermique différentielle et des amphiboles par diffraction des rayons X avec leur sensibilité maximum de 0,5 à 1 pour cent (183, 217, 41).

En contre-partie, apparaît un inconvénient considérable de cette méthode : on n'étudie en effet que des quantités de particules de l'ordre du microgramme, lesquelles doivent à tout prix être représentatives de l'ensemble des particules. Cela paraît possible dans le cas des solutés injectables où la quantité de particules par unité de volume est relativement faible. Par contre, en ce qui concerne le talc, il est difficile d'être certain que, même en appliquant une technique rigoureuse d'échantillonnage, ces quelques microgrammes examinés sont représentatifs d'un lot d'extraction de plusieurs centaines de kilogrammes.

• COMPARAISON AVEC LA MICROSCOPIE A BALAYAGE :

Nous voudrions enfin souligner que si la microscopie électronique analytique par transmission est désavantagée par rapport à la microscopie analytique à balayage puisqu'elle ne permet pas l'observation du relief des particules, elle présente l'avantage de rendre très facile l'identification de l'amiante Chrysotile grâce à la mise en évidence de son canalicule central.

3.4.2. RESULTATS.

Nous voudrions, en plus des commentaires réalisés lors de la présentation des résultats, faire quelques estimations en ce qui concerne le niveau du risque entraîné par les fibres d'amiante rencontrées dans divers échantillons.

- Données de base :

  Poids d'une fibrille unitaire de Chrysotile de 100 nm de long = $2,3\ 10^{-7}$ ng.

  Poids d'une fibre de Chrysotile de 10 µm de long et 1 µm de diamètre = 0,02 ng.

• ESTIMATION DE LA QUANTITE DE TALC ET D'AMIANTE MISE EN SUSPENSION DANS L'AIR A LA SUITE DE L'USAGE D'UN FLACON POUDREUR :

- Volume de la pièce = 20 m^3.
- Une partie seulement du talc utilisé est mise en suspension dans l'air. Estimons-la à 100 mg de façon arbitraire.

Si ce talc contient 1 % de Chrysotile (limite détectable par analyse thermique différentielle), la concentration d'amiante sera de 50 $\mu g/m^3$ d'air. Si ce talc contient 1 o/oo de Chrysotile, la concentration d'amiante sera de 5 $\mu g/m^3$ d'air, et s'il contient 1/10.000 de Chrysotile, la concentration d'amiante sera de 500 $\mu g/m^3$ d'air.

A titre comparatif, rappelons que le standard B.O.H.S. de contamination des ateliers de travail de l'amiante est de deux fibres visibles au microscope optique par cm^3 d'air, concentration au-delà de laquelle le risque de contracter l'asbestose est de 1 % pour une exposition de 25 ans (38).

Cette concentration en fibres correspond environ à une concentration pondérale de 0,02 ng/cm^3 d'air, soit 20 $\mu g/m^3$ d'air, d'après l'estimation précédente du poids d'une fibre.

• LE NIVEAU DE POLLUTION DES ATMOSPHERES : URBAINES correspond à des valeurs allant de 0,1 à 1 ng/m^3 (freins de voitures, pollution de fond).

On constate donc que les quantités d'amiante Chrysotile trouvées dans les échantillons E 3, F 5, E 6, F 2 et de talc, sont peu significatives et présentent un niveau de risque négligeable en comparaison des valeurs précédentes.

Par contre, les méthodes d'analyse thermique différentielle et de diffraction des rayons X, en détectant difficilement des contaminations inférieures à 1 %, apparaissent insuffisantes pour détecter des quantités aussi faibles (229).

Une estimation semblable en ce qui concerne le soluté contaminé par l'amiante nous donne un chiffre de 10^{-5} ng de Chrysotile par millilitre de soluté (20 fibrilles par grille), soit en cas d'administration de 1 litre de soluté : 10^{-2} ng, ce qui semble relativement faible également.

Cependant, bien que l'on puisse considérer ces chiffres comme peu alarmants, il convient de rappeler que l'amiante étant considéré comme toxique, il apparaît difficile d'admettre une présence, aussi minime soit-elle, dans un médicament dont le rôle est de redonner la santé au malade, et ceci dans la mesure où la technologie peut permettre son élimination. Nous savons d'ailleurs que le Service Central de la Pharmacie a soumis aux fabricants une recommandation allant dans ce sens.

CONCLUSIONS

Notre travail a porté sur trois points :

- *Un essai de classification et d'évaluation des méthodes d'étude de la contamination particulaire des médicaments.*
- *La mise au point et le développement dans le cadre du service commun de Microscopie Electronique de l'Institut Pasteur de Lyon d'une méthode d'étude en microscopie électronique et microanalyse des rayons X de la contamination particulaire.*
- *La présentation de résultats d'analyses portant d'une part sur divers médicaments injectables du commerce et d'autre part sur des talcs et produits de toilette à base de talc.*

Il ressort de la première partie de notre travail que pour contrôler la contamination particulaire des médicaments injectables, trois types d'investigation paraissent possibles :

- *Le contrôle visuel direct, tel qu'il est réalisé dans l'industrie en France actuellement nous paraît convenir à un contrôle d'atelier de fabrication, et ne peut être vraiment utile que s'il porte sur la totalité du lot de fabrication. Nous pensons avec les pharmaciens d'industrie, que malgré ses insuffisances, cette méthode ne semble pas devoir être abandonnée actuellement.*
- *Les méthodes de comptages sont réalisées sur un échantillon-*

nage de la fabrication ; elles nous paraissent devoir être pratiquées systématiquement par le laboratoire d'analyses et de contrôle en complément du contrôle de fabrication.

- Les méthodes d'analyse qualitative et en particulier de microanalyse ne nous semblent pas pour l'instant, en raison de leur longueur et de leur coût, être utilisables de façon systématique. Nous proposons de faire appel à elles de façon épisodique ou à l'occasion de cas particuliers : contamination brutale d'un lot de fabrication, installation d'une nouvelle chaîne de fabrication, contrôle de l'efficacité des opérations de nettoyage des chaînes de fabrication.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous nous sommes attachés à mettre au point une méthodologie d'étude des contaminants particulaires qui exclue de la meilleure façon possible les risques de contamination des échantillons en cours de leur préparation ou de leur analyse.
Dans ce cas, la microscopie électronique analytique nous est apparue comme étant une méthode indispensable pour l'analyse qualitative des particules et la recherche de la présence éventuelle d'amiante dans les médicaments.

La dernière partie de ce travail apporte d'une part des résultats concernant l'étude qualitative des particules minérales contenues dans les solutésinjectables du commerce. La contamination par les particules de verre et les particules métalliques (Fer, Chrome, Cuivre) est fréquente. A cette occasion, divers processus d'attaque des récipients en verre par les solutés ont pu être mis en évidence et discutés. La microscopie électronique analytique à transmission et à balayage apporte des possibilités intéressantes pour l'étude du verre et de sa résistance aux solutés et devrait permettre le développement de travaux ultérieurs. La présence de très faibles taux d'amiante a été décelée dans un des solutés étudié

Une autre série de résultats a trait à 19 échantillons de talc et de produits de toilette à base de talc ; 4 d'entre eux m[illegible] trent la présence d'amiante chrysotile en faible quantité.

doute non décelable par les autres méthodes actuelles ; un des échantillons est par contre riche en amiante Trémolite.

Nous souhaitons avoir montré par notre travail, tout l'intérêt des techniques de microanalyse et de microscopie électronique pour observer et analyser les particules, ces identifications devant permettre d'améliorer les technologies galéniques de fabrication.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :

M. ROLLET

VU, LE DIRECTEUR DE L'U.E.R.
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES.

Ch.A. BIZOLLON

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
LYON, LE
LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ
CLAUDE BERNARD

D. GERMAIN

R E S U M E

Après une première partie contenant une revue bibliographique des problèmes relatifs à la contamination particulaire des médicaments, ce travail envisage dans une deuxième partie les différentes méthodes d'étude de la contamination particulaire ; l'auteur s'est efforcé d'apporter une contribution à leur classification. L'accent est mis plus particulièrement sur les méthodes d'analyse qualitative des particules et notamment la microscopie électronique analytique.

Dans la troisième partie, le travail expérimental réalisé est présenté. Une méthode d'analyse qualitative de la constitution chimique élémentaire des particules par microscopie électronique à transmission couplée à la spectrométrie X en énergie a été mise au point ; elle est largement décrite. Cette méthode expérimentale a été appliquée d'une part à l'étude qualitative de la contamination particulaire des solutés injectables, et d'autre part à la recherche d'amiante dans les talcs.

L'auteur présente et discute une série de résultats.

B I B L I O G R A P H I E

1 - ADAMS (D.F.), TORD (B.O.) and KOSEK (J)
Cotton Fiber embolization during angiography
Radiology, 1965, 84, 531.

2 - AMACKER (P) and BOYMOND (P)
Contrôle de la présence de particules étrangères dans un soluté injectable à l'aide d'un compteur COULTER
Pharm.Acta Helv., 1967, 42, 357-364.

3 - ANONYME
Particles in intravenous fluids
J. Hosp.Pharm., 1967, 24, 217.

4 - ANONYME
Selected annotated references to particulate matter in parenteral solutions.
Drug Intelligence, 1967, 1, 21-25.

5 - ANONYME
Particle counting Technology
Contamination control, 1969, 8, 11-25.

6 - ANONYME
Hydrolytic resistance of glassware for pharmaceutical use
J.Pharm. Belg, 1971, 26, 272-291

7 - ANONYME
Solution Check box.
Mod. Hosp. 1971, 117, 118.

8 - APTE (B.K.)
Particulate Matter in IV infusions
East Pharm., 1972, 15 : 27-31.

9 - ARAUD (D.)
Considérations sur la présence de particules étrangères dans les solutés massifs injectables.
Thèse médecine, Nancy, 1970 (122).

10 - ARAUD (D), MOREAU (R) et VIGNON (H)
Les particules dans les solutés injectables : Influence de la perfusion à des lapins de solutés massifs contenant des particules de concentration et de diamètre connus.
Journal de Médecine de Lyon, 1972, 1223, 239-244.

11 - ARMSTRONG (J.T.)
Quantitative chemical analysis of individual micropartic using the electronmicroprobe. Theoretical.
Analyst. Chem. 1975, 47, (13), 2178-2193.

12 - ARTZ (W.), FISCHER (M.P.) and SIMON (F)
Panel discussion : considerations in parenteral productions.
Bull. Parenteral Drug Ass., 1973, 27, 165-177.

.../...

13 - AZRIA (M)
Les contaminants particulaires et les médicaments
R.Sci. Techn.Pharm, 1973, 2, (6), 271-283.

14 - BALDWIN (B.E.)
New Developments in hypodermic needles
Bull.Parent.drug Ass., 1971, 25, 270-278

15 - BEAMAN (D.R.)
Quantitative determination of asbestos fiber concentrations.
Anal.Chem., 1976, 48, 101-110.

16 - BEER (M)
Electron Microscopy
Anal.Chem., 1974, 46, 428 R-430 R.

17 - BENESOVA (L), DOUBEK (M) and MOHELSKA (H), A note on the preparation of particulate matérial for an electron microscopic study.
Folia Biologica, 1975, 21, 414-416

18 - BENOIST (D) and de VAULX-CAIMMI (B)
Technique de contrôle particulaire des ampoules vides
Ann.Pharm. Fr., 1973, 31, (12), 727-734

19 - BIGG, (E.K.) ONO (A) and WILLIAMS (J.A.)
Chemical tests for individual submicron aerosol particles
Atmospheric Environment, 1974, 8, 1-13

20 - BLANCHARD (J), THOMPSON(C.M) and SCHWARTZ (J.A.)
Comparison of methods for detection of particulate matter in large-volume parenterals
Am.J.Hosp.Pharm., 1976, 33, 144-150

21 - BLAUG (S.M.) et coll
Determination of particulate matter in intravenous solutions using the Coulter counter
Bull. Parenteral Drug Ass., 1975, 29, (2), 74-88.

22 - BLEJER (M.P.) and ARLON (R)
Talc : a possible occupational and environmental carcinogen
J.Occup. Med. USA, 1973, 15, (2), 92-97

23 - BOUCHER (C.L.) and SLOOT (H.A)
An improved Method for visual inspection of injections.
Pharm. Weekblad, 1965, 100 : 253-262

24 - BOURDEAU (M.) et NASLAIN (R.)
Principes et exemples d'application du microanalyseur par sonde électronique
Ann. Fals. Exp. Chim., 1974, 67, (717-718), 297-339

25 - BOURGEOIS (G)
Un aspect méconnu de la technologie verrière :
La fabrication par étirage des ampoules et flacons à usage pharmaceutique.
Prod. et Prob. Pharm, 1969, 24, (3), 1-12.

.../...

26 - BOYETT (J.B.) and AVIS (K.E.)
Extraction rates of Marker compounds from rubber closures for parenteral use.
Bull. Parent. Drug Ass., 1975, 29, (1), 1-17.

27 - BRALY (G.)
Remarques sur les réactions histologiques pulmonaires à l'introduction de particules inertes par voie intraveineuse chez le lapin.
Thèse médecine, Lyon, 1972.

28 - BRUNZELL (A) and NILSSON (G.)
Metal particles in eye ointments dispensed in metal tubes
Acta Pharm. Suecica, 1973, 10, 247-253.

29 - BUTOR (J.F.)
Application des techniques de la microscopie électronique à l'étude de l'aérosol atmosphérique
Rapport C.E.A-R 4709 commissariat à l'énergie atomique 1976.

30 - BYERS (R.L) DAVIS (J.W) MATSON (W.L) Mc KINSTRY (H.A)
Particle size and shape characterization by scanning electron microscope
A.I.Ch. E. Symp. Ser. USA, 1974, 70, (137), 322-326.

31 - CARAMELLA (C.) et coll.
L'uso della microscopia a scansione nella determinazione dei fattori di forma delle particelle.
Farmaco Ed. Prat., 1975, 30, (6), 282-290.

32 - CARTMEL (R.) and GERRARD (H.N)
The Coulter counter
Pharm. J., 1963, 191, 383-384.

33 - CARUGATI (E.), RUGGINENTI (G.) and ZORZETTO (C.)
I corpi estraeni nelle preparazioni parenterali.
Il Farmaco, 1970, (2), 65-94.

34 - CARVER (L.D.) and LAMBERT(M.C.)
need for particle size standards in fluid contamination mesurements
Contam. Control, 1972, 11, 11-17

35 - CASCIOLI (D), Di GIOVANNI (G.C.) and PETRANGELI (B.)
Use of ampuls and multiple doc vials.
Boll. Chim Farm., 1974, 113 : 532-34.

36 - CASTAING (R.)
Microanalyse par émission X
Conférence, ass. anciens élèves de l'INSA LYON sept 1963.

37 - CAVATORTA(L.), PIETRA(E.)and ALLIEVI (R.)
Présence of foreign particles in injectable solutions.
Boll. Chim. Farm, 1969, 108, 488-498.

38 - CHAMBON (R.) et CHAMBON (P.)
Etude de micro-polluants d'origine industrielle :
II. l'Amiante
Lyon pharmaceutique, 1973, 24, (5), 627-638.

39 - CHAMBON (P.), MINAUD-VANPEL (B.) et CHAMBON (R.)
Analyse de suies atmosphériques lyonnaises.
Centre Belge d'Etude et de Documentation des eaux, 1974, 365, 225-229

40 - CHASON (J.L.), LANDERS (J.W.) et SWANSON (R.E.)
Embolie par filtre de coton : une complication fréquente des angiographies cérébrales.
Neurology,1963, 13, 558-560.

41 - CHUDZIKOWSKI (R.J.)
Spotlight on talc
Soap. perfumery cosmetics, 1975, 48, (2), 56-65.

42 - COCKS (G.W.)
Chemical Microscopy
Anal. Chem., 1974, 46, 420 R. - 428 R.

43 - COLE, (M.) and BOND (C.P.)
Recent advances in automatic image analysis using a television system
J. Microscopy, 1972, 96, 89-96.

44 - COOPER (D.F.) and BARRETT (C.W.)
Particulate matter from giving sets
Pharm. J., 1970, 205, 186-187.

45 - COUPER (I.A.), Mc ADAM (J.H.), MACKENZIE (M.J.) and DAVIDSON (J.F.)
Contamination of factor VIII concentrates with metal particles.
Lancet, 1974, 2, 1515.

46 - CRALLEY (L.J.), KEY (M.M.), GROTH (D.H.) LAINHART (W.S.) and LIGO (R.M.)
Fibrous and Mineral content of cosmetic talcum products
Am. Ind. Hyg. Ass. J., 1968, 29, 350-354.

47 - CRAM (R.F.) and CHREKIAN (G.P.)
General considerations concerning drug particle size and particle size determination.
Bull. Parent. Drug Ass., 1965, 19, 110-114.

48 - CRONE Mc (W.C.)
Microscopical characterization of glass fragments.
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1972, 55, 834-839.

49 - CRONE Mc et coll.
The particle Atlas, ed two, Ann Arbor Science publishers, Ann Arbor, Michigan.

50 - CUNNINGHAM (H.M.) and PONTEFRACT (R.D.)
Asbestos fibers in beverages, drinking water and tissues their passage through the intestinal wall and movement through the body.
J. Ass. Offic. Anal. Chem., 1973, 56, 976-981.

51 - CURBY(W.A.)
Applications for the multichannel particle size analyzer
Bull. Parenteral Drug Ass., 1969, 5, 208-214.

.../...

52 - DAVIS (N.M.)
"It's a good thing When Filters clog"
Hosp Pharm., 1973, 8, 5.

53 - DAVIS (R.), KARUHN (R.), GRAF(J.)and STOCKHAM (J.)
Measurement of fiber size distribution in parenteral solutions.
Bull. Parent. Drug. Ass., 1975, 29, (2), 98-109.

54 - DAVIS (N.M.) and TURCO (S.)
A study of particulate matter in I.V. infusion fluids (phase 2)
Amer. J. Hosp. Pharm., 1971, 28, 620-623.

55 - DAVIS (N.M.), TURCO(S.) and SIVELLY (E.)
Study of particulate matter in I.V. infusion fluids.
Am. J. Hosp. Pharm., 1970, 27, 822-826.

56 - DELLY (J.G.) and Mc CRONE (W.C.)
Setting up a microscopy laboratory for identification of particles.
Contamination Control, 1967, 6, 10-15.

57 - DE LUCA (P.P.) and KOWALSKY (R.J.)
Problems arising from the transfer of sodium bicarbonate injection from ampuls to plastic disposable syringes.
Amer. J. Hosp. Pharm., 1972, 29, 217-222.

58 - DI GAETANO (T.N.)
Optimizing the EMHART AUTOSKAN inspection system using the Evap Method.
Bull.Parenteral Drug Ass., 1975, 29, 183-191.

59 - Di GRADO (C.J.)
Measurement of particulate matter in the air.
Bull. Parenteral Drug Ass., 1964, 18, 19-28.

60 - Di GRADO (C.J.)
Liquid-borne Particle Counting in the pharmaceutical industry.III : Method evaluation.
Bull. Parenteral Drug Ass., 1970, 24, (2), 62-67.

61 - DOUHAIRIE (B.)
Prévention et élimination des contaminants particulaires
Rev. Sci. Techn. Pharm., 1973, 2, 6

62 - DRAFTZ (R.G.) and GRAF(J.)
Identifying particle contaminants.
Bull. Parenteral Drug Ass., 1974, 28, (1), 35-52.

63 - DUMA,(R.J.)
Particulate Matter of particular interest
Ann. Intern.Med, 1973, 78, 146-147.

64 - DUNGAN (D.J.)
Particulate contamination in pharmaceutical préparations for injections.
Australasian J. Pharm., 1968, 49, S59-S64.

.../...

65 - EDAX
Energy Despersive Analysis of X Rays and the electron Microscope.
EDAX international, Prairie View, Illinois, 1975.

66 - EDIRIMANASINGHE(S.M.), LEMBERGER (A.P.) and PERRIN (J.H.)
Effect of repeated puncture on the particulate matter contamination of multidose vials as assessed by the industrial Model B. Coulter counter.
Acta Pharm. Suecica, 1968, 5, 501-508.

67 - ELLO (I) et coll.
Control of particulate matter in distilled water by electronic particle counter (Celloscope 202)
Acta Pharm.Suecica 1966, 3, (6), 419-22.

68 - ERNEROT (L.)
Ampins - the problems of "clear solution" and of particle shedding
Acta Pharm. Suecica, 1968, 5, 101-110.

69 - ERNEROT (L.)
Particle counting in infusion fluids
Acta Pharm. Suecica, 1974, 11, 1-14.

70 - ERNEROT (L.)
Silting Index determination-an alternative to particle counting for the control of particulate contamination in infusion fluids.
Acta. Pharm. Suecica, 1974, 11, 15-24.

71 - ERNEROT (L.)
Studies on the problem of particulate matter in parenteral products
Svensk Farm T., 1974, 78, (3), 129-139.

72 - ERNEROT (L.) and DAHLINDER (L.E.)
Contamination of ampuls in connection with opening
Acta Pharm. Suecica, 1969, 6, 401-406.

73 - ERNEROT (L.), HELMSTEIN (I) and SANDELL (E.)
Some factors influencing the measured content of particulate matter in infusion fluids
Acta. Pharm. Suecica, 1970, 7, 501-508.

74 - ERNEROT (L.) and MELLSTRÖM (G.)
Foreign particles in powder ampoules and vials.
Acta Pharm. Suecica, 1969, 6, 283-286.

75 - ERNEROT (L.) and SANDELL (E.)
Membrane filtration during administration of infusion fluids for élimination of particulate matter.
Acta Pharm. Suecica, 1967, [illegible]

76 - ERNEROT (L.) and SANDELL (E.)
The shedding of particles [illegible]
Acta Pharm. Suecica, [illegible]

77 - EVERHART (J.E.) and HAYES (T.L.)
The Scanning electron microscope
Scientific American, 1972, 226, 54-69.

78 - FAUDOT (D.)
Comptage et étude des dimensions des cellules ou particules présentées à un système optique
Spectra 2000, Nov.1976, n° 30.

79 - FILS (F.)
Etude critique de l'analyse granulométrique par microscopie
Prod.et Probl.Pharm, 1971, 26, 599-621.

80 - FRASER (D.A.)
Absolute method of sampling and measurement of solid airborne particulates : combined use of the molecular filter membrane and electron microscopy.
Arch.Ind. Hyg.Occ.Med., 1953, 8, 412-419.

81 - FURGANG (F.A.)
glass particles in ampuls
Anesthes., 1974, 41, 525.

82 - GARVAN (J.M.) and GUNNER (B.W.)
Intravenous fluids, a solution containing such particles must not be used
Med. J. Australia, 1963, 2, 140-145

84 - GARVAN (J.M.) and GUNNER (B.W.)
The harmful effects of particles in IV fluids
Med. J. Aust. 1964, 2, 1-6

85 - GARVAN (J.M.) and GUNNER (B.W.)
Particulate contamination of intravenous fluids
Brit. J. Clin.Pract, 1971, 25 : 119-121.

86 - GESLER (R.M.)
Biologic effects of polystyrène latex particles administred intravenously to rats
Bull.Parent.Drug.Ass., 1973, 27, 101-113.

87 - GINN Mc (A.B.)
Control of particulate matter in preparation of parenteral containers
Bull.parent.Drug.Ass., 1972, 26, (1), 26-33.

88 - GINN Mc (A.B.)
Panel discussion : Mechanical inspection of ampuls II : Ampul inspection using the Rota Machine.
Bull.parent.Drug Ass., 1973, 27,(6), 247-250.

.../...

89 - GODDARD (J.L.)
Address to the parenteral drug association.
Bull. Parenteral Drug. Ass., 1966, 20, 183-188.

90 - GREENE (G.E.)
Selection of rubber closures for parenterals
Bull.Parenteral Drug.Ass., 1973, 27, 195-200.

91 - GRIVET(P) et coll
Optique électronique, tome II
Bordas, 1958.

92 - GROSS (M.A.)
Danger of particulate matter in solutions for intravenous use.
Drug Intelligence, 1967, 1 ; 12-13.

93 - GROVES (M.J.)
Particles in intravenous fluids.
Lancet, 1965, 2, 344.

94 - GROVES (M.J.)
Some size distributions of particulate contamination found in commercially available intravenous fluids.
J. Pharm.Pharmac., 1966, 18, 161-167.

95 - GROVES (M.J.)
Harmful effects of particles in parenteral solutions, methods for their detection.
J. Hosp.Pharm., 1968, 25, 17-21.

96 - GROVES (M.J.)
The size distribution of particles contaminating parenteral solutions.
Analyst, 1969, 94, 992-1001.

97 - GROVES (M.J.)
Progress towards a standard to limit particulate contamination in intravenous fluids.
J. Pharm.Pharmac., 1971, 23, Suppl., 238 S - 239 S.

98 - GROVES (M.J.)
Particulate contamination in intravenous fluids.
I : nature, origin and hazard.
Pharm. J., 1973, 210, 185-187.

99 - GROVES (M.J.)
Detection of particles in I.V. solutions using the Nuclepore Prototron counter
Pharm. J., 1974, 213, (5797), 581-582.

100- GROVES (M.J.) and MAJOR (J.F.G.)
Assessment of particulate material in normal saline solution for injection B.P. by means of the Coulter counter
Pharm. J., 1964, 193, 227-228.

101 - GROVES (M.J.) and YALABIK (H.S.)
Size analysis of sub.micron particles by centrifugal photosedimentometer
J. Pharm. Pharmacol., 1974, 26, suppl., 77 P - 78 P.

102 - GUICHARD (J.C.)
La mesure de la contamination particulaire dans l'industrie pharmaceutique
R.Sci. Techn.Pharm., 1973, 2, (6), 285-295.

103 - GUICHARD (J.C.) et de BERNARD (A.)
Un appareil de mesure granulométrique : le compteur automatique Coulter
Chim.anal., 1965, 47, (3), 145-151.

104 - HALEY (T.J.)
Asbestosis : a reassessment of the overall problem.
J. Pharm. Sci., 1975, 64, (9), 1435-1449.

105 - HALLOCK (W.K.)
Cleaning Techniques for Rubber Closures
Bull.Parenteral Drug. Ass., 1971, 25, 2.

106 - HALLWORTH (G.W.) and BARNES (P.)
The use of an image analyser to determine the particle size distribution of salbutamol for use in metered dose inhalation aerosols.
J. Pharm. Pharmaco., 1974, 26, Suppl.,78 P - 79 P.

107 - HAMLIN (W.E.), SCOTHORN (W.W.) and RIEBE (K.W.)
Experiences with a prototype Television Inspection Device : I Detectability of subvisible particles.
Bull.Parent. Drug Ass., 1977, 31, (2), 86-93.

108 - HAMMER (H.F.)
Problems of particulate matter in sterile solid products for injection.
Bull.Parenter.Drug Assoc., 1974, 28, 205-215.

109 - HANNAH, (R.W.) and DWYER (J.L.)
Infrared analysis of suspended particulates with Millipore filters and attenuated total reflection
Anal. Chem. 1968 36 : 2341-2344

110 - HARTL (J.)
Zur Problematik von Asbestfasern und anderen partikeln in parenteralen Losungen
Dtsch.Apotheker Ztg, 1973, 113,48.

111 - HENDRIKS (A.H.C.)
Quantitative X Ray Microanalysis in the transmission electron microscope
Bulletin analytical équipment, Philips, Eindohven, Netherlands, Mai 1975.

112 - HENDRIKS (A.H.C.) and WALINGA(J.)
The analysis of aerosols using the
Transmission Electron Analytical Mi
Bulletin analytical équipment Philips Dec.197

113 - HERRMANN (D.) et coll.
Critères de qualité pour les matières premières utilisées dans le conditionnement des médicaments.
Pharm.Industr., 1974, 36, (11), 849-856.

114 - HERSEY (J.A.)
Particulate contamination of parenteral solutions.
paper presented to the conference on "Uses of the Coulter counter in pharmaceutical industry" Basle, Switzerland, 13 Nov. 1969.

115 - HICKS (C.I.), GALLARDO (J.P.B) and GUILLORY (J.K.)
Stability of sodium bicarbonate injection stored in polypropylène syringes.
Amer. J. Hosp. Pharm., 1972, 29, 210-216.

116 - HINSON (A.L.)
Fluoride Washing of glass containers
Bull.Parent. Drug Ass., 1971, 25, (6), 266-269.

117 - HIRTZ
La contamination des solutés injectables.
Bull.Soc.Pharm. Strasbourg, 1955, 15.1.

118 - HO(N.F.H.)
Particulate matter in parenteral solutions.
I. A review of the litterature
Drug Intelligence, 1967, 1, 7-11.

119 - HO (N.F.H.), CHURCH (R.L.) and LEE (H.)
Particulate matter in intravenous injections and administration sets.
Drug Intelligence, 1967, 1, 356-361.

120 - HOHMANN (R.C.), CONCA (N.) and MUNNELLY (K.P.)
Image projection for quantitating particulates in parenteral products
Bull. Parent.Drug Ass., 1973, 27, (2), 96-100.

121 - HOPKINS (G.H.)
Pulmonary angiothrombotic granulomatosis in drug offenders.
J. Amer.Med.Assoc., 1972, 221, 909-911.

122 - HOPKINS (G.H.)
Improved machine design for stopper washing
Bull. Parent. Drug Ass., 1973, 27, (3), 114-125.

123 - HOPKINS (G.H.) and YOUNG (R.W.)
Correlation of microscopic with instrumental particle counts.
Bull. Parent. Drug Ass., 1974, 28,(1), 15-25.

124 - HOWARTH (W.R.)
Environment control in parenteral filling operations.
Bull. Parent. Drug Ass., 1972, 26, (3), 147-151.

.../...

125 - HUBER (R.C.) and RIFFKIN (C.)
Inline final filters for removing particles from intravenous infusions of amphotericin B.
Am. J. Hosp. Pharm. 1975, 32, 173-176.

126 - HUDSON (H.E.)
A method of measuring matter suspended in liquids
Pharm. J., 1961, 186, 201-203.

127 - JACOB (M.) et coll.
A propos des ampoules autocassables : conditionnement de solutés buvables et de collyres.
Trav.Soc. Pharm. Montpellier, 1974, 34, (4), 319-325.

128 - JAFFE (N.S.)
Elimination of particulate contamination from ophtalmic solutions for intraocular surgery.
Bull. Parenteral Drug Assoc., 1970, 24, 218-225.

129 - JAMINET (F.)
Considérations sur la réactivité des matériaux de conditionnement avec les formes pharmaceutiques et sur leur pouvoir de protection.
Prod.et Prob.Pharm, 1968, 23, (7), 375-391.

130 - JAQUES (W.E.) et MARISCAL (G.G.)
Etude de l'incidence des embolies par fibres de coton.
Bull. Intern. Assoc. Med. Museums, 1951, 32, 63-72.

131 - JENNINGS (J.)
Regulatory aspects of parenteral drugs
Bull. Parent. Drug Ass., 1972, 26, (2), 53-57.

132 - JOHANNESEN (B.), ASLAKSEN (B.) and WAALER (T.)
The chemical conditions of different types of glass infusion bottes by storage of aqueous solution. I The release of silicium.
Medd. Norsk. Farm. Selskap, 1965, 27, 65-82.
Dans International Pharmaceutical Abstracts.

133 - JOHANNESEN (B.), ASLAKSEN (B.) and THOM (E.)
Chemical condition of different infusion glass flasks against aqueous solutions of medicaments ofter storage. III libération of calcium
Medd. Norsk. Farm. Selskap., 1967, 29, 55-63.
Dans International Pharmaceutical Abstracts.

134 - JOHNSON(K.T.), HEPLER (C.D.) and GALLARDO (J.P.B.)
Particulate contamination in vials of sterile dry solids.
Am. J. Hosp.Pharm., 1970, 27, 968-976.

135 - KALMUS (E.H.)
Préparation of aérosols for électron microscopy.
J. Appl. Physics, 1954, 24, 87-89.

136 - KAPLAR (L) and NAGY (G.T.)
Control of silicone coating of injection ampuls and drug bottles.
Acta. Pharm. Hung., 1972, 42, 203-209.

137 - KAYE (R.C.) and SEAGER (H.)
A note in the determination of particle size by dielectric measurement.
J. Pharm. Pharmacol., 1968, 20, 54-57.

138 - KERNY (P.) TABILLON (M.) VILLARD (J.) et BRAVARD (J.P.)
Méthodes d'examen de la limpidité et du degré d'opalescence des liquides et des solutions incolores.
An. Pharm. F. 1973, 31, 91-102.

139 - KIRNBAUER (E.)
Liquid borne particle counting in the pharmaceutical industry. I : microscopic counting.
Bull. Parent. Drug Ass., 1970, 24, (2), 53-58.

140 - KONWALER (B.E.)
Pulmonary emboli of cotton fibers
Am. J. Clin. Path. 1950, 20, 385.

141 - KRAMER (W)
Inspection for particulate matter essential to IV additive program.
Drug Intelligence Clin. Pharm. 1970, 4 : 311-313.

142 - KRAMER (W.), TANJA (J.J.) and HARRISSON (W.L.)
Précipitates found in admixtures of Potassium chloride and Dextrose 5 % in Water.
Amer. J. Hosp. Pharm., 1970, 27, 548-553.

143 - KRUEGER (E.O.)
Determination of particulate matter in large volume parenterals.
Bull. Parent. Drug Ass., 1972, 26, (2), 96-100.

144 - KRUEGER (E.O.) and RIGGS (T.H.)
Objectives : PMA Parenteral Particulate Matter contamination.
Bull. Parent. Drug Ass., 1968, 22, 99-103.

145 - LACHMAN (L.), LIEBERMAN (A.A.) and KANIG (J.L.)
The théory and practice of industrial pharmacy
Sterile Product KENNETH E. AVIS 563-603
Voir rubrique particles.

146 - LACHMAN (L) et coll
Non-Microbial particulate contamination in the processing of Pharmaceutical dosage Form
J. Mond. Pharm. (F.I.P.) 1971, 14, (1-2), 90-107.

147 - LAMY (P.) et coll
Laminar flow : a method for contamination control
J. Mond. Pharm. (F.I.P.), 1971, 14, (1-2), [illegible]

148 - LEACH (D.)
Use of laminar flow in manufacturing large volume parenteral products.
Bull. Parent. Drug Ass., 1972, 26, (3), 104-107.

149 - LEE (J.) and SAPIRA (J.D.)
Retinal and cerebral Microembolization of talc in a drug abuser.
Amer. J. Med. Sci., 1973, 265, 75-77.

150 - LEVINSON (R.S.),ALLEN (L.V.), STANASZEK (W.F.) and MILLS (S.)
Détection of particles in intravenous fluids using scanning électron microscopy.
Am. J. Hosp. Pharm., 1975, 32, 1137-1141.

151 - LIM (Y.S.), TURCO (S.) and DAVIS (N.M.)
Particulate matter in small volume parenterals as determined by two methods
American, J. Hosp. Pharm., 1973, 30, 518-525.

152 - LINES (R.W.)
Detection and measurement of particles in I.V. fluids
For the residential course for hospital pharmacists, CAFNCOED HOSPITAL Swansea, November 1966.

153 - LINES (R.W.)
Counting of particulate matter in parenteral solutions. Part I : Survey of the literature.
Bull. Parent. Drug Ass., 1967, 21, 113-117.

154 - LINES (R.W.)
Counting of particulate matter in parenteral solutions part II : Particle counting in small containers.
Bull. Parent. Drug Ass., 1967, 21, 118-123.

155 - LINES (R.W.)
Letters to the éditor. An insertable orifice tube for in situ contamination counts of solutions in opened ampoules and vials using the COULTER counter.
J. Pharm. Pharmac., 1967, 19, 701-702.

156 - LOUER(R.C.), RUSSOMAN (J.A.) and RASANEN (P.R.)
Detection of particulate matter in parenteral solutionsby image projection : a concept and its feasibility.
Bull. parent. Drug. Ass., 1971, 25, 54-62.

157 - LOUGHHEAD (H.O.) and MUFFETT (J.A.)
Environmental cleanliness for the production of small volume parenteral products.
Bull. Parent. Drug Ass., 1972, 26, (3), 102-105.

158 - LUCKEWICZ (W.)
Differential Thermal Analysis of Chrysotile Asbestos in Pure Talc and Talc containing other minerals
J. Soc. Cosmet. Chem., 1975, 26, 431-437.

159 - MADSEN (W.S.)
Particle contamination in parenteral medicaments
Acta Pharm. Chemi, 1968, 75, 3-16.

160 - MAES (F.)
Détection et élimination des particules solides en suspension dans les solutés injectables.
France Pharmacie 1966, 22, (1), 37-46.

161 - MAGATH. (T.B.) and Mc CIELLAN (J.T.)
Réaction to accidently injected rubber plugs
Am. J. Clin. Pathol., 1950, 20 : 829-833.

162 - MAGNAN (C.)
Traité de microscopie électronique
Hermann, Paris, 1961.

163 - MANALAN (D.A.)
Asbestos removal by membrane filters.
Bull. Parent. Drug Ass., 1974, 28, (5), 247-251.

164 - MANALAN (D.A.) and RETI (R.)
Detection and removal of asbestos fibers from liquids.
Rapport de la société Millipore corporation, Bedford, Massachussetts.

165 - MARTYN (G.W.Jr)
Utilization of rondo unscrambler and Strunk units in ampuls inspection.
Bull. Parent. Drug Ass., 1970, 24, 281-283.

166 - MASUDA (J.Y.)
Particulate contamination of spray dried and lyophilized injectable carbenicillin.
Am. J. Hosp. Pharmacy., 1974, 31, 1189-1192.

167 - MASUDA (J.Y.) and BECKERMAN (J.H.)
Particulate matter in commercial antibiotic injectable products.
Am. J. Hosp. Pharm., 1973, 30, 72-76.

168 - MEAD (W.B.)
Particles in intravenous fluids
N.Engl. J. Med., 1972, 287, 1152.

169 - MERLISS (R.R.)
Talc and asbestos contaminant of Rice.
J. Am. Med.Ass., 1971, 216,(13), 2144.

170 - MILLIPORE
Analysis of I.V. solutions for particulats matter.
Application report AR-2, 1967.

171 - MILLIPORE
Analyse de particules aérosol à l'aide du système ΤΓ MC
Rapport d'application AR 141
Millipore corporation, Bedford, Massachusetts.

.../...

172 - MILLIPORE,
Particulate analysis of large volume parenteral products
Documentation AB 803, Millipore corporation, Bedford, Massachusetts, USA, 1975.

173 - MILLIPORE
Detection et analyses des pollutions par particules
Documentation ADM 30, Millipore corporation, Bedford, Massachusetts.

174 - MILLIPORE
πMC Particle Measurement computer system
Bulletin MB 402, Millipore corporation, Bedford, Massachusetts.

175 - MILLIPORE,
Microchemical and instrumental analysis.
Documentation ADM 70, Millipore corporation, Bedford, Massachusetts, USA, 1964.

176 - MORGAN (E.), FINCHER (J.H.), SADIK (F.) and MIKEAL(R.L.
Evaluation of laminar air flow and nursing station environments for the préparation of intravenous admixtures.
Amer. J. Hosp. Pharm., 1972, 29, 1020-1024.

177 - MUSLIN (L.)
Liquid borne particle counting in the pharmaceutical industry. II : Light - Scattering instruments.
Bull. Parent. Drug Ass., 1970, 24, (2), 59 - 62.

178 - NAIDO (N.T.), PRICE (C.H.) and Mc CARTHY (T.J.)
Preservative loss from ophtalmic solutions during filtration sterilization.
Aust. J. Pharm. Sci, 1972, (N.S.1), 16-18.

179 - National Formulary XIII
Am. Pharm. Ass., Washington, 1970.

180 - NEEDHAM (T.E.) and LUZZI (L.A.)
Particulate Matter in polyvinyl chloride intravenous bags
N. Engl. J. Med., 1973, 289, 1256.

181 - NGOCTUAN (H.)
La détection des particules dans les solutés injectables.
Pharmascopie 1975, 4, (3), 16-7.

182 - NICHOLSON (W.J.), MAGGIORE (C.J.) and SELIKOFF (I.J.)
Asbestos contamination of parenterals drugs.
Science, 1972, 177, (4044), 171-173.

183 - norme : C.T.F.A. Specification
Cosmetic tal[illegible]
The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Associat[illegible]
Washington, 1971.

184 - norme ASTM - F 25-63 T.

185 - norme : ASTM - F50-65 T.

186 - norme : ASTM D 2430 - 65 T.
Identification of metallic and fibrous contaminants in aerospace fluids.

187 - norme : ASTM F 59 - 68
Standard method for identification of metal particulate contamination found in the electronic and microélectronic composants and systems using the ring oven technique with spot tests.

188 - norme : SAE - ARP - 743.

189 - norme : U.S. Federal Standard 209 B.

190 - OIE S. and WAALER (T.)
Sodium and potassium extraction from different types of injection glass.
Medd. Nor. Farm. Selsk., 1970, 32, 115-124.
Dans International Pharmaceutical Abstracts.

191 - PAGES (A.), MARTY (M.) et ROUSTAN (J.)
Les lésions artérielles pulmonaires par corps étrangers accidentellement introduits au cours de perfusions abondantes.
IVème congrès national de transfusion sanguine, 1964, Montpellier, vol.I, 239-242.

192 - PASK (J.A.) and WARNER (M.F.)
Fundamental Studies of talc : I - constitution of talcs
J. Amer. Ceram. Soc., 1953, 37, (3), 118-128.

193 - PAULING (L.)
Structure of mica and related minerals
Proc. Natl. Acad. Sci., 1930, 16, 123-129.

194 - Pharmacopée Belge, V, 1962.

195 - Pharmacopée britanique 1973.

196 - Pharmacopée DAB 7/DDR 1969

197 - Pharmacopée Française
VIIIe Ed., Maisonneuve, Paris, 1965.

198 - Pharmacopée Française
IXe Ed., Maisonneuve, Paris,1974.

199 - Pharmacopée Helvetique VIE Ed., 1972.

200 - Pharmacopée internationale 1967.

201 - Pharmacopée Italienne VII, 1973.

.../...

202 - PIECORO (J.J.), GOODMAN (N.L.), WHEELER (W.E.), GWILT (P.R.) and RAPP (R.P.)
Particulate matter in reconstituted amphotericin B and assay of filtered solutions of amphotericin B.
Amer.J. Hosp.Pharm., 1975, 32, (4), 381-384.

203 - PONSOT (J.F.), ARTHAUD-RICHTER (Y.) et GRIMAUD (J.A.)
Microscopie électronique par transmission et micro-analyse des rayons X par dispersion d'énergie.
Rev. Institut Pasteur Lyon, 1975, 8, (2), 155-172.

204 - PORTER (M.C.)
New particle counter for nondestructive monitoring of parenterals.
Bull. Parent. Drug Ass., 1975, 29, (4), 169-182.

205 - PROCEEDINGS of the FDA Symposium on safety of large volume Parenteral Solutions.
Washington D.C., July 28-29, 1966.

206 - QUICK (R.G.)
Microscopic method for measurement of particulate contamination.
Contamination Control, 1970, 9, (18-19), 22-28.

207 - RAIMAN (H.L.) et coll
Environmental sampling in an aseptic environment.
Microbiological environmental manitoring. Particulate contamination control.
Cross contamination control.
Bull. Parenteral Drug Ass., 1974, 28, (6), 253-269.

208 - RAPP (R.P.), BIVINS (B.) and De LUCA (P.)
In Line filtration of I.V. fluids and Drugs.
Am. J. IV. ther, 1975, 2, 18-23.

209 - RAPP (R.), BIVINS (B.), SCHROEDER (H.) and DE LUCA(P.F
Evaluation of a prototype air-venting inline intravenous filter set.
Am. J. Hosp. Pharm., 1975, 34, 1253-1259.

210 - RASANEN (P.R.) and LOUER (R.C.)
Panel discussion : Mechanical inspection of ampuls I. Ampul inspection using Autoskan equipment.
Bull. Parent. Drug Ass., 1973, 27, (6), 243-247.

211 - RASTRELLI (G.F.) et coll.
La formazione de particelle nelle soluzioni parenteral
Boll. Soc. Ital. Farm. Ospedal., 1974, 20, (4), 265-27

212 - REBAGAY (T.), SCHROEDER (H.G.), IM (S.) and De LUCA (P.P.)
Particulate Matter Monitoring I. Evaluation of some Membrane Filters and Microscopic Techniques.
Bull. Parent. Drug Ass., 1977, 31, (2), 57-69.

213 - REÏS (T.)
Le microscope électronique et ses applications.
Presse universitaire de France, Paris, 1951.

214 - RENOZ (L.)
Problem of size determination of drug particles and the necessity for specifications.
J. Pharm. Belg., 1971, 26, 166-182.

215 - REYNIER (J.P.) et BOVIS (A.)
De l'intérêt des filtres sur les nécessaires à perfusion.
Labo. pharma. Prob. Techn., 1976, 250, 51-52.

216 - ROLAND (M.)
Risques inhérents à l'administration des injectables.
R. Sci. Techn. Pharm., 1973, 2, (10), 537-549.

217 - ROSE (H.A.)
Detection and determination of chrysotile in talc U.S.P.
J. Pharm. Sci, 1974, 63, 268-269.

218 - ROSEMAN (T.J.), BROWN (J.A.) and SCOTHORN (W.W.)
Glass for parenteral products : A surface view using the scanning electron microscope.
J. Pharm. Sci., 1976, 65, (1), 22-29.

219 - RÖSSLER (R.)
Prévention et élimination des pyrogènes
Rev. Sci Techn. pharm., 1975, 4, (3), 167-178.

220 - ROUGEOT (L.)
Les rayons X
Presse Universitaire de France, Paris, 1974.

221 - RUSS (J.C.)
Elemental X ray analysis of materials
C.J. Walsh Ed., Prairie View, Illinois, 1972.

222 - RUSSEL (J.H.)
Pharmaceutical applications of filtration-part 2.
J. Hosp. Pharm., 1970, 28 : 125-126.

223 - RYAN (P.B.), RAPP (R.P.), De LUCA (P.P.), GRIFFEN (W.O.Jr.), CLARK (J.D.) and CLOYS (D.)
In line final filtration.A method of Minimizing contamination in intravenous Therapy.
Bull. Parent. Drug. Ass., 1973, 27, (1), 1-14.

224 - SANDELL (E.)
Visual inspection of ampuls.
Acta Pharm. Suec, 1974, 11, 504-508.

225 - SANDELL (E.) and ERNEROT (L.)
Control of injections by visual inspection and electronic particle counter (Celloscope 202).
Acta. Pharm., Suecica, 1966, 3, 229-234.

226 - SANDELL (E.) and ERNEROT (L.)
Membrane filtration during administration for élimination of glass particles from ampuls.
Acta. Pharm. Suecica, 1968, 5, 111-113.

227 - SARRUT (S.) et NEZELOF (C.)
Une complication de la thérapeutique intraveineuse : l'artérite pulmonaire macrophagique à cellules géantes.
Presse Méd., 1960, 68, (10), 375-376.

228 - SATAKOPAN (S.)
Identification of contaminating particulate matter in parenteral preparations
Indian J. Pharm., 1969, 31, 95-97.
Dans International Pharmaceutical abstracts.

229 - SCHELZ (J.P.)
The detection of chrysotile asbestos at low levels in talc by Differential Thermal Analysis.
Thermochimica Acta, 1974, 8, 197-204.

230 - SCHMITT (W.H.)
Control and analysis of particulate matter by membrane filtration.
Bull. Parent. Drug. Ass., 1964, 18, 25-31.

231 - SCHOEN (D.R.)
Practical experience with particle problems.
Bull. Parent. Drug. Ass., 1968, 22, 24-30.

232 - SCHWARTZ (M.A.)
An analysis of a Hospital's I.V. additive service.
Bull. Parent. Drug. Ass., 1969, 23, 78-80.

233 - SCHWARTZ (D.M.)
A general method of calculating particle size distributions.
J. Microscopy , 1972, 96, 25-36.

234 - SELME (P.)
Le microscope électronique
Presse Universitaire de France, Paris, 1963.

235 - SHERER (R.P.)
Particulate contamination in small-volume, multidose parenteral solutions.
Pharm. J., 1975, 214, (5823), 553-554.

236 - SHERMAN (N.E.)
Contamination control in contact filling of small volume parenterals.
Bull. parent. Drug. Ass., 1970, 24, (3), 148-152.

237 - SILBERMAN (J.)
Embolie par corps étrangers suivant une angiographie cérébrale.
Arch. Neurol., 1960, 3, 711-717.

.../..

238 - SILVERMAN (L.), BILLINGS (C.E.) and FIRST (M.W.)
Particle size analysis in industrial hygiène.
Academic Press New York and London 1971

239 - SKINNER (F.S.)
Contamination des solutions parentérales par des particules étrangères, sa caractérisation et sa réduction.
Pharma.Indust., 1971, 33, (10), 677-683.

240 - SMITS (H.) and FREEDMAN (L.R.)
Prolonged venous catheterisation as a cause of Sepsis
New Eng. J. Med., 1967, 276, 1229-1233.

241 - Société française des sciences et techniques pharmaceutiques - section lyonnaise.
Détection des particules dans les solutés injectables.
Rapport d'une commission présidée par J. BERNASCONI.
R. Sci. Techn. Pharm., 1973, 2, (10), 515-525.

242 - SOKOL (M.)
Final filtration système in parenteral production.
Bull. Parent. Drug Ass., 1969, 23, (2), 63-68.

243 - SOKOL (M.) and BOYD (J.)
Sampling techniques in analysis for particulate matter.
Bull. Parent. Drug Ass., 1968, 22, 9-12.

244 - SOMERVILLE (T.G.) and GIBSON (M.)
Particulate contamination in ampoules : a comparative study.
Pharm. J., 1973, 211, 128-130.

245 - SPEIL (S.)
Absbestos Minerals in modern technology
Environ. Res., 1969, 2, 166-208.

246 - STEHBENS (W.E.) and FLOREY (H.W.)
Devenir dc particules injectées par voie intraveineuse observé au niveau des oreilles du lapin.
Quater. J. Exp. Physiol. 1960, 45, 252-254.

247 - STOKES (T.F.), SUMNER (E.D.) and NEEDHAM (T.E.)
Particulate contamination and stability of three additive in 0,9 % sodium chloride injection in plastic and glass large-volume containers.
Am. J. Hosp. Pharm., 1975, 32, 811-826.

248 - SUZUKI (Y.) and AITA (S.)
Identification of submicroscopic asbestos fibrils in tissue by analytical electron microscopy.
JEOL News, 1974, 12, (2), 2-4.

249 - SUZUKI (M.), AITA (S.) and HAYASHI (H.)
An attempted use of analytical electron microscope for semi quantitative analysis of clay minerals.
JEOL News, 1975, 13, (1), 7-9.

.../.

250 - SWIFT (R.G.) Jr., SEARCY (D.M.) and PICKARD (A.S.)
Effect of in line final filtration on occurence of Phlebitis.
Drug. Intell.Clin. Pharm., 1975, 9, 76-79.

251 - TALIAFERRO (B.A.)
Occurence of particulate matter in reconstituted antibiotics.
Bull. Parent. Drug Ass., 1972, 26, (6), 290-295.

252 - THOMAS (W.H.) et coll
Particles in I.V. solutions. Microtechnique measurement
Acta. Pharm. Suecica, 1974, 11, (5), 495-503.

253 - THOMSON (J.)
"Particulate contamination in commercial ampoules for injection"
Pharm. J. New Zealand 1974, 36, (2), 26-27.
dans International Pharmaceutical Abstracts.

254 - TIMBRELL (V.), GILSON (J.C.) and WEBSTER(I.)
UICC Standard reference samples of Asbestos
Int. J. Cancer, 1968, 3, 406-408.

255 - TIMBRELL (V.) and RENDALL (R.E.G.)
Preparation of the UICC Standard reference samples of Asbestos.
Powder Technol., 1971/72, (5), 279-287.

256 - TRAISNEL (M.) et GUYOT (J.C.)
L'analyse granulométrique
Labo.pharma, Prob.techn., 1972, 213, 95-103.

257 - TRASEN (B.C.)
Reduction of particulate matter in pharmaceuticals
Drug. Cosmetic ind. 1968, 102, 40-42.

258 - TRASEN (B.)
Detection and reduction of particulate matter in Pharmaceuticals.
Chem. Eng. Progress, 1968, 64, 2.

259 - TRASEN (B.)
Membrane filtration technique in analysis for particulate matter.
Bull. Parent. Drug. Ass., 1968, 22, 1-8.

260 - TUFTS (B.J.)
Determination of micron-sized particles-detection of potassium ion.
Anal. Chem., 1959, 31, 2, 242-243.

261 - TURCO (S.J.)
Hazards associated with parenteral therapy.
Bull. Parent. Drug Ass., 1974, 28, 197-204.

.../...

262 - TURCO (S.J.) and DAVIS (N.M.)
Detrimental effects of particulate matter on the pulmonary circulation.
J. Am. Med. Assoc., 1971, 217, (1), 81-82.

263 - TURCO (S.) and DAVIS (N.M.)
Glass particles in intravenous injections
N. Engl. J. Med., 1972, 287, (23), 1204-1205.

264 - TURCO (S.) and DAVIS (N.M.)
Preventing the injection of glass particles with furosemide solution
Hosp. Pharm. 1972, 7 : 423-424.

265 - TURCO (S.) and DAVIS (N.M.)
Clinical significance of particulate matter.
A review of the literature
Hosp. Pharm., 1973, 8, 137-139.

266 - TURCO (S.) and DAVIS (N.M.)
Comparison of commercial final filtration devices
Hosp. Pharm., 1973, 8, 141-159.

267 - TURCO (S.J.) and DAVIS (N.M.)
Comparaison of final filtration devices.
Bull. Parent. Drug. Assoc., 1973, 27, (5), 207-227.

268 - TURCO (S.) and DAVIS (N.M.)
Particulate matter in I.V. infusion fluids-phase 3.
Amer. J. Hosp. Pharm., 1973, 30, 611-613.

269 - UHLIR (A.)
Contrôle des ampoules pour les particules insolubles.
Analyse des systèmes d'essai.
Pharm. Industr., 1974, 36, (8), 582-588.

270 - USP XVIII 1970

271 - USP XIX, First Supplément
USP-NF 1975, p.56.

272 - VARSANO (J.)
Evaluation and Training for a Parenteral inspection Machine.
Bull. Parent. Drug Ass., 1969, 23, (4), 186-190.

273 - VESSEY, (I.) and KENDALL (C.E.)
Determination of particulate matter in intravenous fluids.
Analyst, 1966, 91, 273-279.

274 - VESSEY (I.) KENDALL,(C.E.) and PETERS (F.E.)
Particulate matter in intravenous fluids.
Med. J. Australia, 1966, 1 , 293-294.

275 - VIALARD-GOUDOU (A.), GIMONET (M.) et FONTAINE-BIENFAIT (J.)
Un nouveau procédé de photographie au service de l'analyse granulométrique par microscopie en pharmacie
Labo.Pharma Prob.techn., 1972, 207, 34-37.

.../...

276 - VICARIO (F.)
Microscopie électronique à balayage.
Rev.Athanor, association des élèves ingénieurs de l'institut de chimie et physique industrielles de Lyon n° 1 1975.

277 - VON GLAHN (W.C.) and HALL (J.W.)
The reaction produced in the pulmonary arteries by emboli of cotton fibers.
Am.J. Pathol, 1949, 25, 575-584.

278 - VRANCKX (H.), LAMBERT (G.) et ROLAND (M.)
Observations sur la poluttion particulaire des solutions de perfusion et du matériel d'administration des solutions injectables.
J. Pharm. Belg., 1970, 25, 115-132.

279 - WALKER (D.R.)
Misconceptions about automatic counters
Contamination Control, 1969, 8, 15-21.

280 - WALKER (D.R.)
What about automatic particle counters.
Presented to american association for contamination control, 8 th annual Meeting,New York, May 1969.

281 - WALSH (R.J.) and MONAHAN (J.A.)
Panel discussion : mechanical inspection of ampuls. III : ampul inspection using the Strunck machine.
Bull. Parent. Drug Ass., 1973, 27, (6), 250-256.

282 - WARTMAN (W.B.), HUDSON (B.) and JENNINGS (R.B.)
Experimental arterial disease. II : the reaction of the pulmonary artery to emboli of filter paper fibers.
Circulation, 1951, 4, 756-763.

283 - WEISSLER (A.)
The scientific basis for FDA regulatory aditives in cosmetics.
J. Soc. Cosmet. Chem., 1974, 25, (2), 102-107.

284 - WHITBY (K.T.)
Particle sizing in the milling industry.
Cereal Science Today, 1961, 6, 49-52.

285 - WHITLOW (R.J.), NEEDHAM (T.E.) and LUZZI (L.A.)
Generation of particulate matter in large-volume parenteral containers.
J. Pharm. Sci, 1974, 63, (10), 1610-1613.

.../...

286 - WILLIAMS (A.) and BARNETT (M.I.)
Particulate contamination in intravenous fluids, administration sets and cannulae.
Pharm. J., 1973, 211, 190-191.

287 - WINDING (O.) and HOLMA (B.)
Method for determination and element analysis of particulate contamination in injectable solutions.
Am. J. Hosp. Pharm., 1976, 33, 1154-1159.

288 - WYNN (J.B.)
Mechanization of ampul inspection.
Bull. Parent. Drug. Ass., 1968, 22, 13-23.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION..... 1

Première Partie : LA CONTAMINATION PARTICULAIRE DES MEDICAMENTS..... 2

1. INTRODUCTION - HISTORIQUE..... 3

2. NATURE DES CONTAMINANTS PARTICULAIRES..... 8

2.1. Définition - Terminologie..... 8

2.2. Recensement et classification des principaux contaminants..... 9

3. LES CAUSES DE CONTAMINATION PAR DES ELEMENTS PARTICULAIRES..... 11

3.1. Sources primaires ou directes..... 11

3.1.1. L'environnement terrestre, aquatique et aérien..... 11

3.2.1. L'homme lui-même émet une quantité considérable de particules diverses..... 11

3.2. Sources secondaires ou indirectes.... 13

3.2.1. Les locaux de travail..... 13

3.2.2. Le personnel..... 15

3.2.3. Les opérations d'entretien.... 15

3.2.4. Les matières premières..... 15

Pages

3.2.5. Les conditionnements..... 17

3.2.5.1. Comportement différent des flacons de verre et des récipients en plastique.... 18

3.2.5.2. Les bouchons de caoutchouc générateurs de particules.. 19

3.2.6. Appareillages, modes de fabrication et stockage..... 20

3.2.6.1. Opérations de transfert et de manipulation..... 20

3.2.6.2. Les divers appareillages et procédés de fabrication. 21

3.2.7. Contamination particulaire apparue lors de l'utilisation du médicament..... 23

3.2.7.1. Ouverture des récipients... 23

3.2.7.2. Les accessoires d'administration..... 24

4. CONSEQUENCES DE LA CONTAMINATION PARTICULAIRE DES MEDICAMENTS..... 27

4.1. Conséquences sur les caractères organoleptiques..... 27

4.2. Conséquences sur la stabilité..... 27

4.3. Conséquences sur l'innocuité du médicament..... 28

4.3.1. Introduction..... 28

4.3.2. Facteurs dont dépend le risque 28

4.3.2.1. Le nombre des particules administrées..... 28

4.3.2.2. La forme galénique et la voie d'administration..... 29

4.3.2.3. La nature et les diverses caractéristiques des particules..... 29

Pages

4.3.2.4. La taille des particules.... 30

4.3.2.5. Cas particulier de l'amiante 31

4.3.3. Histopathologie des lésions dues aux particules..... 32

4.3.4. Preuves des effets pathogènes des particules présentes dans les formes injectables..... 33

4.3.4.1. Preuves apportées par la clinique humaine..... 33

4.3.4.1.1. Injections intra-artérielles..... 34

4.3.4.1.2. Voie intra-veineuse..... 35

4.3.4.2. Expérimentation animale..... 37

4.3.5. Conclusion..... 39

5. LEGISLATION ET NORMALISATION..... 40

5.1. Contamination particulaire des préparations injectables : la position des pharmacopées..... 40

5.2. Les efforts de normalisation..... 43

5.2.1. Difficultés d'établir des normes de contamination particulaire..... 43

5.2.1.1. Difficultés liées à la diversité des formes et des médicaments..... 43

5.2.1.2. Difficultés liées aux techniques d'étude..... 44

5.2.1.3. Difficultés liées à la méconnaissance de la pathologie des particules..... 45

Pages

5.2.2. Les principales tentatives de normalisation de la contamination particulaire.... 46

5.2.2.1. Les atmosphères de travail dans l'Industrie Pharmaceutique..... 46

5.2.2.2. Les diverses formes pharmaceutiques non parentérales.. 47

5.2.2.3. Récipients et accessoires d'administration..... 47

5.2.2.4. Les principales tentatives et propositions de normes pour les formes injectables 47

5.2.2.5. Normes particulières au cas de l'amiante..... 49

5.3. Conclusion..... 50

6. LES MOYENS DE LUTTE CONTRE LA CONTAMINATION PARTICULAIRE..... 51

6.1. Introduction..... 51

6.2. Lutte au niveau de la fabrication.... 51

6.3. Lutte au niveau de l'utilisation..... 52

6.4. Conclusion..... 54

Pages

Deuxième Partie : LES METHODES D'ETUDE DE LA CONTAMINATION PARTICULAIRE DES MEDICAMENTS.. 55

1. GENERALITES..... 56

1.1. Notions d'analyse granulométrique... 56

1.2. Problèmes posés par l'échantillonnage 58

1.3. Expression numérique du degré de contamination..... 58

2. LES METHODES D'ETUDE DES PARTICULES DANS LES SOLUTES INJECTABLES..... 60

2.1. Les méthodes non destructrices du contenant..... 60

2.1.1. Contrôle optique humain avec déplacement manuel de l'échantillon..... 61

2.1.2. Contrôles optiques comportant un transfert automatique de l'échantillon..... 61

2.1.3. Contrôle par machines entièrement automatiques..... 62

2.2. Etude de la contamination particulaire par les méthodes destructrices du contenant..... 63

2.2.1. Généralités..... 63

2.2.2. Méthodes de comptage automatique des particules..... 64

2.2.2.1. Généralités et principes... 64

Pages

2.2.2.2. Méthodes basées sur la mesure des effets des particules sur un rayonnement.... 65

2.2.2.2.1. La néphélométrie..... 65

2.2.2.2.2. Les appareils utilisant un rayon laser..... 65

2.2.2.2.3. Les appareils utilisant la diffusion de la lumière (light scattering)..... 66

2.2.2.2.4. Les appareils utilisant l'absorption de la lumière 69

2.2.2.3. Appareils utilisant une mesure de variation conductimétrique 71

2.2.2.4. Cas particulier : Comptages automatiques par des méthodes non destructrices du contenant 75

2.2.3. Méthodes d'observation et de comptage par microscopie des particules..... 75

2.2.3.1. Microscopie optique..... 75

2.2.3.1.1. Généralités..... 75

2.2.3.1.2. Examen visuel et comptage direct par l'opérateur.... 76

2.2.3.1.3. Photographie de l'image observée au microscope.... 77

2.2.3.1.4. Utilisation d'appareils de comptage automatique : analyseurs d'images..... 77

2.2.3.1.5. Conclusion..... 79

2.2.3.2. Microscopie électronique.... 80

2.2.3.2.1. Généralités..... 80

2.2.3.2.2. Le microscope électronique à transmission..... 83

2.2.3.2.3. Le microscope électronique à balayage..... 87

2.2.3.2.4. Conclusion : Comparaison du M.E.T. et du M.E.B. ... 89

2.2.3.3. Corrélations entre les comptages microscopiques et instrumentaux de particules. 91

Pages

2.2.4. Méthodes d'analyse de la constitution chimique des particules..... 92

2.2.4.1. Introduction..... 92

2.2.4.2. Généralités et terminologie 93

2.2.4.3. Macro-analyse chimique particulaire..... 94

2.2.4.4. Micro-analyse chimique particulaire..... 95

2.2.4.5. Macro-analyse instrumentale particulaire..... 95

2.2.4.6. Micro-analyse instrumentale particulaire..... 96

2.2.4.6.1. Principe de la microscopie électronique analytique.. 98

2.2.4.6.2. Possibilités pratiques de la microscopie électronique analytique..... 101

3. METHODES D'ETUDE DE LA CONTAMINATION PARTICULAIRE DES FORMES PHARMACEUTIQUES AUTRES QUE LES PREPARATIONS INJECTABLES.. 102

Pages

Troisième Partie : APPLICATION DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ANALYTIQUE A L'ETUDE DES CONTAMINANTS PARTICULAIRES DE DEUX FORMES GALENIQUES..... 104

- PREPARATIONS INJECTABLES : étude quantitative des particules.
- TALCS : recherche de l'amiante.

1. INTRODUCTION..... 105

2. MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE D'ETUDE DE LA CONTAMINATION PARTICULAIRE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE ET MICRO-ANALYSE..... 107

2.1. Description et références du matériel analytique utilisé..... 107

2.1.1. Microscope électronique analytique à transmission..... 107

2.1.1.1. Caractéristiques techniques spécifiques du microscope Philips EM 300..... 107

2.1.1.2. Caractéristiques techniques spécifiques du micro-analyseur EDAX 707 B..... 108

2.1.2. Matériel annexe de microscopie électronique..... 110

2.2. Méthodes de préparation des échantillons..... 113

2.2.1. Description du poste de travail 113

2.2.2. Contrôle de l'efficacité de la hotte..... 114

2.2.3. Technique propre de préparation des échantillons - Nettoyage du matériel..... 115

Pages

2.2.4. Méthodes de préparation des échantillons particulaires pour la microscopie électronique... 116

2.2.4.1. Première phase : Obtention d'un pool particulaire..... 117

2.2.4.2. Préparation des échantillons en vue de la microscopie électronique analytique par transmission..... 118

2.2.4.2.1. Méthodes par minéralisation 120

2.2.4.2.2. Méthodes par dissolution.. 124

2.3. Méthodologie d'investigation des échantillons..... 126

- Les phases de l'analyse qualitative en microscopie électronique analytique par transmission..... 127

3. APPLICATIONS A DIVERS CAS DE CONTAMINATION 134

3.1. L'amiante..... 134

3.2. Etude qualitative des contaminants particulaires dans divers solutés injectables du commerce..... 148

3.2.1. Nature et origine des échantillons étudiés..... 148

3.2.2. Résultats..... 150

3.2.3. Commentaires des résultats..... 172

3.2.3.1. Commentaires généraux..... 172

3.2.3.2. Commentaire particulier à l'échantillon N° 4..... 175

Pages

3.3. Recherche d'amiante dans les talcs d'origines diverses..... 183

3.3.1. Rappels minéralogiques sur le talc et l'amiante..... 183

3.3.2. Nature et origine des échantillons étudiés..... 184

3.3.3. Résultats..... 185

3.3.4. Commentaires des résultats..... 197

3.4. Discussion - Critique générale de notre travail..... 198

3.4.1. Méthode..... 198

3.4.2. Résultats..... 201

CONCLUSIONS..... 204

RESUME..... 207

BIBLIOGRAPHIE..... 208

TABLE DES MATIERES..... 233

Edité par l'Institut Pasteur de Lyon
— 1977 —